

Aus der Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
(Direktor: Prof. Dr. Matthias Hannig)

Zum Einfluss von Pellikel und Schwarztee auf die Zahnpastenabrasion von Schmelz und Dentin

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnheilkunde der
Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2015**

vorgelegt von: Annika Behrendt geb. Schwarz
geb. am: am 21.03.1981 in Aschersleben

Tag der Promotion: 21.09.2015
Dekan: Prof. Dr. M.D. Menger
1. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Hannig
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Laschke

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	1
1.1 Deutsche Zusammenfassung	1
1.2 Abstract	2
2 Einleitung	4
2.1 Zahnaufbau	5
2.1.1 Schmelz	5
2.1.2 Dentin	5
2.2 Pellikel	6
2.2.1 Bildung, Aufbau und Zusammensetzung	6
2.2.2 Funktionen der Pellikel	11
2.3 Ätiologie der Abrasion	14
2.3.1 Abrasion	14
2.3.2 Attrition	14
2.3.3 Keilförmige Defekte	15
2.4 Zahnpasten	15
2.5 Polyphenole	16
2.5.1 Definition Phenol	16
2.5.2 Unterteilung der Polyphenole	17

Inhaltsverzeichnis

2.5.3	<i>Teepolyphenole</i>	21
2.5.4	<i>Physiologische Wirkungen des Tee's</i>	22
2.6	Fragestellung	24
3	Material und Methoden	26
3.1	Studiendesign	26
3.2	Herstellung der Schmelz-Dentin-Proben	26
3.3	Vorbehandlung der Schmelz-Dentin-Proben	26
3.4	Zahnpasta Mischung	27
3.5	In-vitro-Pellikel	28
3.6	In-situ-Pellikel	29
3.7	Messungen der Schmelz-Abrasion	30
3.8	Messungen der Dentin-Abrasion	30
3.8.1	<i>Statistische Analyse</i>	31
3.9	TEM-Analyse	31
3.9.1	<i>Fixierung der Pellikel</i>	31
3.9.2	<i>Entwässerung und Einbettung der Proben</i>	31
3.9.3	<i>Herstellung von befilmten Kupfer-Grids</i>	32
3.9.4	<i>Schneiden am Ultramikrotom</i>	32
3.9.5	<i>Kontrastierung</i>	32
3.9.6	<i>TEM-Analyse</i>	32

Inhaltsverzeichnis

4 Ergebnisse	33
4.1 Abrasionswerte der Schmelz- und Dentinprüfkörper	33
4.1.1 Zahnpastenabrasion auf Zahnschmelz	33
4.1.2 Zahnpastenabrasion auf Dentin	36
4.2 TEM-Analyse der Dentinproben	39
4.2.1 TEM-Bilder der Kontrollproben (ohne Pellikel)	39
4.2.2 TEM-Bilder der In-vitro-Pellikel	41
4.2.3 TEM-Bilder der In-situ-Pellikel	44
4.2.4 TEM-Bilder der In-vitro-Pellikel unter dem Einfluss von Schwarztee	47
4.2.5 TEM-Bilder der In-situ-Pellikel unter dem Einfluss von Schwarztee	51
5 Diskussion	55
5.1 Diskussion Material und Methodik	55
5.1.1 Studiendesign und Fragestellung	55
5.1.2 Art, Herstellung und Bearbeitung der Prüfkörper	55
5.1.3 Pellikelgewinnung	56
5.1.4 Probandenauswahl	59
5.1.5 Abrasion	60
5.1.6 Mess- und Analysemethoden	62
5.1.7 TEM-Analyse	62
5.1.8 Polyphenole	63
5.2 Diskussion der Ergebnisse	65
5.2.1 Abrasionsmessungen auf Zahnschmelz	65
5.2.2 Abrasionsmessungen auf Dentin	67
5.2.3 TEM-Analysen	68

Inhaltsverzeichnis

5.3 Schlussfolgerung und klinischer Bezug	70
6 Literaturverzeichnis	72
7 Publikationen/Danksagung.....	85

Zusammenfassung

1 Zusammenfassung

1.1 Deutsche Zusammenfassung

Auf der Zahnoberfläche entsteht durch die Adsorption von Speichelproteinen innerhalb von Sekunden eine azelluläre, bakterienfreie Schicht, die sogenannte Pellikel. Die Pellikel stellt einen physiologischen Schutzfilm aus selektiv adsorbierten Proteinen dar, der die Zahnoberfläche vor abrasiven und erosiven Einflüssen zu schützen vermag. Bisher wurden hauptsächlich In-vitro-Untersuchungen herangezogen, um die protektive Wirkung der Pellikel bei der Abrasion von Schmelz und Dentin durch Zahnpasten herauszustellen. In der vorliegenden Studie soll vergleichend die protektive Bedeutung einer in vitro und einer in situ gebildeten Pellikel sowie deren Modifikation durch Polyphenole im Hinblick auf die Zahnpastenabration von Schmelz und Dentin untersucht werden.

Die Prüfkörper zur Untersuchung des Einflusses der Pellikel auf die Abrasion bestanden aus humanen Schmelz- Dentinproben. Diese wurden zur In-situ-Pellikelbildung von zwei Probanden alternierend an einer herausnehmbaren Oberkiefer-Schiene im Bereich der Prämolaren und Molaren sowohl bukkal als auch palatinal getragen. Den Tragezeiten von zehn Stunden nachts und 2 x 2 Stunden tagsüber über einen Zeitraum von zehn Tagen schlossen sich jeweils 25 Putzzyklen (insgesamt 750 Putzzyklen) unter einer hoch- und einer niedrigabrasiven Zahnpastemischung in einer Zahnputzmaschine an. Ein Teil der Proben wurde außerdem über einen Zeitraum von fünf oder alternativ fünfzehn Minuten zweimal täglich während der Pellikelbildungszeit in schwarzem aufgebrühten Tee exponiert. Analoge Experimente erfolgten mit Schmelz-Dentinproben, auf denen durch Inkubation in humanem Speichel eine In-vitro-Pellikel gebildet worden war. Die quantitative Erfassung der Abrasionswerte erfolgte auf den Schmelzoberflächen durch die Ermittlung von Tiefenunterschieden an den durch einen Knoop-Diamanten vor den Zahnputzexperimenten „eingepprägten“ Kerben. Mit Hilfe des Interferenzmikroskopes konnte die Stufe an der Schmelz-Dentin-Grenze vermessen und dadurch der Abtrag der Dentinoberfläche berechnet werden. Die transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung der Dentinoberfläche diente zur qualitativen Darstellung der Pellikelstruktur und -formation unter dem Einfluss des Zähneputzens.

Die statistische Auswertung der Messdaten zeigte, dass sowohl die in vitro gebildete Pellikel als auch die in situ gebildete Pellikel die Abrasion der Zahnhartsubstanzen beim Zähneputzen –insbesondere an den Dentinproben- signifikant reduzieren kann. Dabei hatte die Abrasivität

Zusammenfassung

der Zahnpasten keinen signifikanten Einfluss auf das Ausmaß der Abrasion von Schmelz und Dentin. An den Dentinproben wies die in situ gebildete Pellikel einen signifikant besseren Schutzeffekt gegenüber der Zahnpastenabrasion auf als die in vitro gebildete Pellikel. Der abrasionsreduzierende Effekt der Pellikelschichten konnte durch die Zugabe von Schwarztee tendenziell weiter verbessert werden. Nach dem Zähneputzen ließen sich transmissionselektronenmikroskopische Pellikelresiduen auf der Dentinoberfläche nachweisen.

Das Ergebnis der vorliegenden Arbeit zeigt erstmals, dass eine in situ gebildete Pellikel die Zahnhartsubstanz signifikant vor dem Einfluss der Zahnpastenabrasion schützen kann.

Zukünftige Untersuchungen werden notwendig sein, um das protektive Potential der Pellikel weiterhin zu erforschen und sich ihre Eigenschaften in Bezug auf die Erhaltung der humanen Zahnhartsubstanz zu Nutze zu machen.

1.2 Abstract

The influence of pellicle and black tea on abrasion of enamel and dentin

Due to selective adsorption of saliva proteins, a non-cellular, bacteria free layer, called pellicle, is formed on the tooth surface within seconds. The pellicle provides a physiological protective layer, which is able to protect the tooth surface against abrasive and erosive challenges. Up to now, mainly in vitro investigations had been performed to show the protective effect of the pellicle concerning toothpaste related abrasion of enamel and dentine.

The present study examines the protective effect of in vitro and in situ formed pellicles and their modification through polyphenols regarding toothpaste induced wear on enamel and dentine.

Human dentin-enamel-slabs were used for the investigation of abrasion. For in situ pellicle formation, the samples were carried on intra-oral appliances in the upper jaw buccally and palatally in the region of the second premolars or first molars by two female volunteers. Pellicles were created during a period of ten days. Each day pellicle formation took place two times daily for two hours, followed by 25 brushing cycles each (in total 750 brushing cycles) with either a high or low abrasive toothpaste in a tooth brushing machine. Additional specimens were exposed to black tea two times daily for either five or fifteen minutes during the pellicle formation period. Analogous experiments were performed with enamel-dentin-

Zusammenfassung

slabs, on which an in vitro pellicle was formed by incubation in human saliva.

Wear on enamel surfaces was measured by depths differences of the indentations of a Knoop diamond before and after the brushing cycles. An interference microscope was used to measure the step between the enamel and dentin surfaces for the evaluation of the wear on dentin. Pellicle ultrastructure and thickness on dentin surface under the influence of tooth brushing were analysed by transmission electron microscopy.

The statistical evaluation showed, that both the in vitro as well as the in situ formed pellicles were able to reduce significantly the wear of tooth surfaces -especially of dentin surfaces- after tooth brushing. The abrasivity of the toothpastes had no significantly influence on the amount of wear on enamel and dentine surfaces. Compared to the in vitro pellicle the protective effect of the in situ formed pellicle was significantly better against wear on dentin slabs. The abrasion reducing effect of the pellicle layer could be increased by black tea application.

The transmission electron microscopic analysis (TEM) showed scattered pellicle residues on the dentine surface after tooth brushing.

The present study shows for the first time, that an in situ formed pellicle has a significant protective effect on tooth surfaces against wear by toothpaste.

Further studies will be necessary to examine the protective potential of the pellicle layer and to clarify how to use its protective properties in order to prevent tooth loss in future.

Einleitung

2 Einleitung

Die Morphologie der Zahnoberflächen und die korrekte Stellung der Zähne zueinander sind für eine effektive Zerkleinerung der Nahrung eminent. Der Schutz der humanen Zahnhartsubstanz vor iatrogenen Schädigungen ist aufgrund der Tatsache, dass Zahnschmelz nicht regenerieren kann, eines der Hauptanliegen der zahnmedizinischen Forschung. Viele Untersuchungen beschäftigen sich in diesem Zusammenhang mit dem protektiven Potential der Pellikelschicht und ihrer klinischen Nutzbarkeit.

Die Bildung der Pellikelschicht wird in mehrere Phasen unterteilt. In der ersten Phase entsteht durch die selektive Adsorption von Speichelproteinen an der Zahnoberfläche (Armstrong, 1968; Leach & Saxton, 1966; Mayhall, 1970; Sønju & Rølla, 1973) über elektrostatische Interaktionen die initiale Pellikel (Dawes, 1963), die innerhalb von wenigen Sekunden (Glantz, Baier, & Christersson, 1996) als elektronendichte Pellikelbasisschicht auf dem Zahn (M. Hannig, 1997; 1999) nachgewiesen werden kann. In der zweiten Phase bestimmen Wasserstoffbrückenbindungen, kovalente Bindungen, Dispersionskräfte und hydrophobe Wechselwirkungen den weiteren Adsorptionsverlauf (M. Hannig, 1994) zwischen Pellikelvorläuferproteinen (saure prolinreiche Proteine, Statherin und Histatin) und den bereits adsorbierten weiteren Proteinen aus dem Speichel (Yao, Lamkin, & Oppenheim, 1999). Nach 30 Minuten bildet sich eine lockere, globuläre Pellikelschicht aus, die nach 90 Minuten ein vorläufiges Wachstumsplateau erreicht (Kuboki et al., 1978; Skjørland, Rykke, & Sønju, 1995; Sønju & Rølla, 1973). Bakterien können über Adhäsion-Rezeptor-Interaktionen an der Pellikeloberfläche adhären (Cassels, Hughes, & Nauss, 1995). Die Pellikel stellt somit die Grundlage für die Entstehung des mikrobiellen Zahnbelages (Plaque) dar, der bereits innerhalb von 24 Stunden pathologische Relevanz im Hinblick auf die Entstehung von Karies oder Zahnfleischentzündungen entwickeln kann.

Die Pellikelschicht ist weiterhin in der Lage, als semipermeable Membran und Ionendepot De- und Remineralisationsprozesse an der Zahnoberfläche zu beeinflussen und kann somit zusätzlich zu ihrer lubrikativen Wirkung den Zahn vor Abnutzungsprozessen schützen (C. Hannig, Berndt, Hoth-Hannig, & Hannig, 2009a; C. Hannig, Spitzmüller, Miller, Hellwig, & Hannig, 2008c; M. Hannig, 1994).

Das Abrasionspotential verschiedener Zahnpasten auf Schmelz und Dentin wurde in zahlreichen In-vitro-Untersuchungen dargelegt (Addy, Hughes, Pickles, Joiner, & Huntington, 2002; Franzò, Philpotts, Cox, & Joiner, 2010; Hefferren, 1976; Hotz, 1983; Joiner, Weader, & Cox, 2004c; Philpotts, Weader, & Joiner, 2005; West, Addy, & Hughes,

Einleitung

1998), ohne dabei jedoch den Effekt der omnipräsenten Pellikelschicht zu berücksichtigen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, den Einfluss einer in vitro sowie einer in situ gebildeten Pellikelschicht vergleichend im Hinblick auf ihre potentielle Schutzfunktion beim Putzen der Zahnhartsubstanz mit Zahnpaste zu untersuchen. Weiterhin wurde der Frage nachgegangen, inwieweit sich die abrasionsprotektive Wirkung der Pellikel durch die Zugabe von Polyphenolen steigern lässt.

2.1 Zahnaufbau

2.1.1 Schmelz

Der Schmelz umschließt das Dentin im koronalen Anteil des Zahnes und ist mit einer Knoop-Härte zwischen 250 KHN an der Schmelz- Dentin- Grenze und 390 KHN an der Schmelzoberfläche die härteste Substanz des menschlichen Körpers.

Der aus Ameloblasten gebildete Zahnschmelz besteht im Wesentlichen aus Kalzium, Phosphat, Karbonat, Magnesium und Natrium. Kalzium und Phosphat bilden zusammen als Apatitverbindung kleine Kristallite. Die hexagonalen Apatitkristallite sind circa 40-60 nm breit und circa 160 nm lang. Schmelzprismen bestehen aus tausenden Schmelzkristalliten, die zusammengefügt von der Schmelz-Dentin-Grenze bis zur Schmelzoberfläche reichen.

Jeder Kristallitkern wird von adsorbierten Ionen und einer Hydratationsschale umgeben.

Die Prismen selbst liegen eingebettet in einer interprismatischen organischen Substanz. Die oralwärts gerichtete Seite des Schmelzes ist auf einer Breite von circa 20-30 µm häufig prismenfrei. Hier lagern dichte Kristallite parallel zur Oberfläche. Besonders in den Fissuren und im zervikalen Bereich der Zahnkrone befindet sich prismenfreier Schmelz (Hellwig, Klimek, & Attin, 2007).

2.1.2 Dentin

Dentin wird im koronalen Anteil von Schmelz ummantelt. Im Zahnwurzelbereich wird es von Zahnzement bedeckt und umschließt die Pulpa.

Weniger stark mineralisiert als Schmelz besteht das Dentin zu ca. 2/3 aus anorganischem und circa 1/4 aus organischem Material, der Restanteil besteht aus Wasser. Der anorganische Anteil setzt sich vorwiegend aus Phosphat und Kalzium zusammen und bildet in kristalliner Form

Einleitung

Apatit bzw. amorphes Kalziumphosphat. Es finden sich keine Prismen. Der organische Anteil des Dentins besteht zu 90% aus Kollagenfibrillen.

Dentin entstammt den Odontoblasten, deren Zellkörper in der Pulpa liegen und deren Fortsätze das Dentin in den Dentinkanälchen bis zur Schmelz-Dentin-Grenze durchziehen.

Das Dentin weist eine Schichtung aus Prädentin, Zwischendentin, zirkumpulpaalem Dentin und Manteldentin auf. Alle Schichten sind unterschiedlich mineralisiert.

Die Dentinkanälchen werden von dem am stärksten mineralisierten peritubulären Dentin ausgekleidet und sind durch weniger dicht mineralisiertes intertubuläres Dentin getrennt.

Unterschieden wird zwischen dem regulär gebildeten Primär- und Sekundärdentin und dem unter äußeren Reizeinflüssen gebildeten Tertiärdentin (Hellwig et al., 2007).

2.2 Pellikel

2.2.1 Bildung, Aufbau und Zusammensetzung

Eine geeignete Substratoberfläche und der Kontakt mit Proteinen sind die Voraussetzungen für die Entstehung eines Biofilms. Die erworbene Speichelpellikel ist das Ergebnis der spontanen, selektiven Speichelprotein-Adsorption an der Zahnoberfläche (Armstrong, 1968; Leach & Saxton, 1966; Mayhall, 1970; Sønju & Rølla, 1973).

Der Begriff „erworbene Pellikel“ wurde von Dawes *et al.* (1963) geprägt, die diese als ein Häutchen auf der Oberfläche von durchgebrochenen Zähnen beschreiben (Dawes, 1963). Die Pellikel ist eine azelluläre und bakterienfreie Struktur, die innerhalb von wenigen Sekunden (M. Hannig & Balz, 1999; Hay, 1967; Skjørland et al., 1995; Vacca Smith & Bowen, 2000a) als elektronendichte Pellikelbasisschicht auf dem Zahn (M. Hannig, 1997; 1999) nachgewiesen werden kann. Der direkten Adsorption an der Zahnoberfläche folgen intermolekulare Interaktionen der Speichelproteine. In Untersuchungen konnten sowohl elektrostatische Wechselwirkungen als auch untergeordnete Adhäsionsmechanismen, wie Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophobe Interaktionen, kovalente Bindungen, Dispersionskräfte und van der Waals-Kräfte beobachtet werden (Vassilakos, Arnebrant, & Glantz, 1992a; 1993; Vassilakos, Arnebrant, Rundegren, & Glantz, 1992b; Vassilakos, Rundegren, Arnebrant, & Glantz, 1992c).

Einleitung

Wird eine gereinigte Schmelzoberfläche der wässrigen elektrolytischen Speichellösung ausgesetzt, gehen vermehrt Calcium-Ionen der Schmelzkristallite in Lösung und hinterlassen eine negativ geladene Schmelzoberfläche mit Phosphat-Ionen (Bennick, Cannon, & Madapallimattam, 1979; Hay, 1973; Moreno, Kresak, & Hay, 1978; 1982). Dies führt zur Ausbildung einer Schicht aus Calcium-Ionen an der negativ geladenen Schmelzoberfläche. Die Adhäsionsprozesse erfolgen über elektrostatische Interaktionen zwischen der Ionen-Doppelschicht und entsprechend geladenen Gruppen der sich anlagernden Proteine. Die Speichelproteine interagieren an der Schmelzoberfläche mit den positiv geladenen Calcium-Ionen und den negativ geladenen Phosphatgruppen, im Speziellen gehen anionische Carboxyl-, Sulfat- und Phosphatgruppen beziehungsweise die kationischen Amino- und Iminogruppen der Speichelproteine elektrostatische Bindungen mit den Hydroxylapatitkristallen des Schmelzes ein (Lie, 1975; Mayhall, 1975; 1977; Q. T. Smith, 1980). Aufgrund der hohen Affinität einzelner Speichelproteine zu dieser Ionenschicht spricht man auch von Pellikel-Präkursoren (sogenannte Vorläuferproteine). Durch Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass es sich hierbei um Phosphoproteine wie Statherin, Histatin und sogenannte saure prolinreiche Proteine handelt, die über Calciumbrücken an die Schmelzoberfläche gebunden werden (Embery, Heaney, & Stanbury, 1986). Aber auch Muzin MG 1 und 2, α -Amylase, Carboanhydrasen, Lactoferrin, bakterielle Glykosyltransferasen, Cystatin, Albumin, Immunglobuline und Lysozym konnten in den ersten Minuten der Pellikelentwicklung nachgewiesen werden, ebenso Lipide und Glykolipide (Al-Hashimi & Levine, 1989; C. Hannig et al., 2004a; C. Hannig, Hoch, Becker, Hannig, & Attin, 2005b; M. Hannig, Döbert, Stigler, Müller, & Prokhorova, 2004b; Vacca Smith & Bowen, 2000a; Yao et al., 2001).

Bereits nach wenigen Minuten ist eine 10-20 nm dicke elektronendichte Basalschicht nachweisbar, die durch eine äußere globuläre, weniger elektronendichte Pellikelschicht ergänzt wird (M. Hannig, 1997; 1999). Die kontinuierliche Adsorption von Speichelproteinen erreicht nach 30- 90 Minuten ein Plateau (Shellis & Duckworth, 1994; Sønju, Christensen, Kornstad, & Rølla, 1974). Danach stellt sich ein Gleichgewicht zwischen Adsorption und Desorption ein (Vacca Smith, Ng-Evans, Wunder, & Bowen, 2000).

Pellikelstruktur und das Ausmaß der Pellikelschicht variieren abhängig von der Lokalisation in der Mundhöhle. So konnte in einer Studie von Hannig und Balz (1999), in welcher Pellikelmuster und Dicke mithilfe der Transmissionselektronenmikroskopie untersucht wurde, Unterschiede zwischen bukkaler und lingualer Lokalisation im Laufe von 24 Stunden herausgestellt werden. Gemeinsam war eine homogen strukturierte, fein-granulierte und

Einleitung

elektronendichte Basalschicht, die bis zu 20 nm dick als initial adsorbierte Pellikelschicht bereits nach einer Minute im TEM detektiert werden konnte. Während in der lingualen Lokalisation ein Maximum von 200 nm Pellikeldicke nach 24 Stunden gemessen wurde, konnten bis zu 1300 nm auf den Proben in bukkaler Position festgestellt werden. Die Struktur wechselte von einem anfänglich globulären Aufbau auf der bukkalen Seite und granulärem Muster auf der lingualen Seite in eine granulär-globuläre Struktur beiderseits im Laufe der 24-stündigen Adsorption von Speichelbiopolymeren. Frühe elektronenmikroskopische Untersuchungen des „exogenen Zahnoberhäutchens“ weisen nach Reifungsprozessen eine granuläre kompakte Struktur aus (P. Berthold, 1979; Lie, 1977). Für die intraoral differierende Pellikelformation sind vermutlich lokal verfügbare Speichelbiopolymere und Scherkräfte bedeutend (M. Hannig & Balz, 1999).

Die Pellikel setzt sich zusammen aus spezifisch und selektiv adsorbierten (M. Hannig & Joiner, 2006; Yao, Berg, Costello, Troxler, & Oppenheim, 2003) Kohlenhydraten, Lipiden und Proteinen (C. Hannig, Hannig, & Attin, 2005a; M. Hannig & Joiner, 2006). Dabei fallen Glykoproteine wie Mucin MG 1 und 2 (Mayhall & Butler, 1976; Sønju et al., 1974; Sønju & Rølla, 1973) und Plasmaproteine wie Fibronectin, Albumin, Fibrinogen und IgG (Carlén, Börjesson, Nikdel, & Olsson, 1998; Carlén, Rüdiger, Loggner, & Olsson, 2003; Kraus, Orstavik, Hurst, & Cook, 1973; Li, Helmerhorst, Troxler, & Oppenheim, 2004a; Orstavik & Kraus, 1973; 1974; Rüdiger, Carlén, Meurman, Kari, & Olsson, 2002) besonders aufgrund ihres hohen Mengenverhältnisses auf. Alle Enzyme, die in die Pellikel integriert werden, befinden sich in einem enzymatisch aktiven, aber immobilisierten Zustand (C. Hannig et al., 2004a; C. Hannig, Hannig, & Attin, 2005a; C. Hannig, Hoch, Becker, Hannig, & Attin, 2005b; Pruitt, Caldwell, Jamieson, & Taylor, 1969; Vacca Smith & Bowen, 2000a). Unter den Monosacchariden belegt der Kohlenhydratnachweis am häufigsten die Glucose (Mayhall & Butler, 1976; Sønju, 1975; Sønju et al., 1974), die wahrscheinlich zu einem großen Anteil aus Glucanen stammt (M. Hannig & Joiner, 2006). Unter den Lipiden können sowohl neutrale Lipide als auch Phospholipide und Glycolipide nachgewiesen werden (B. L. Slomiany, Murty, Mandel, Sengupta, & Slomiany, 1990; B. L. Slomiany et al., 1986).

Die Analyse der Aminosäurezusammensetzung spiegelt die Reifung der Pellikelschicht wider. Eine 15 Minuten alte Pellikel besteht in der Mehrheit aus sauren und neutralen Aminosäuren im Gegensatz zu einer 60 Minuten bestehenden Pellikel, die aufgrund der Proteinaggregation von überwiegend prolinreichen Proteinen einen höheren Anteil an Prolin und Arginin aufweist (Skjærland et al., 1995).

Einleitung

Sönju und Rölla (Sönju & Rölla, 1973) fanden in ihrer Untersuchung der erworbenen Pellikel nach 120 Minuten Bildungszeit heraus, dass im Rahmen der Analyse der Aminosäurezusammensetzung keine Unterschiede zwischen verschiedenen Lokalisationen in der Mundhöhle festgestellt werden konnten. Somit scheint eine selektive Adsorption von Speichelproteinen an der Schmelzoberfläche wahrscheinlich, da sich die Sekrete der Glandula parotis (Armstrong, 1970) und Glandulae submandibularis und -lingualis (Mayhall, 1977) in ihrer Aminosäurezusammensetzung unterscheiden.

Nachgewiesen werden konnten verschiedene Enzyme in der Pellikel, wie α -Amylase, Lysozym, Glycosyltransferasen (B, C, D), Carboanhydrasen (I und II), Lactoferrin, Peroxidasen, Transglutaminasen und Phosphatasen (C. Hannig et al., 2009a; M. Hannig, 2002; Ooshima, Yoshida, & Hamada, 1994b; Orstavik & Kraus, 1974; Vacca Smith & Bowen, 2000a).

Lysozym, dessen Aktivität bereits nach drei Minuten Pellikelbildungszeit nachgewiesen werden kann, besitzt antikörperunabhängige antibakterielle Eigenschaften. Es hydrolysiert Bakterienzellwände und erhöht die Permeabilität der Bakterienzellmembran, woraus elektrolytische und osmotische Änderungen resultieren. Die polykationische Erscheinung von Lysozym verleiht dem Enzym zusätzlich, unabhängig der enzymatischen Aktivität, antimikrobielle Eigenschaften. Es aktiviert bakterielle Autolysine, auch wenn sie enzymatisch inaktiv vorliegen. Die Aktivität von Lysozym wird nicht durch Bildungszeit oder Lokalisation der Pellikel in der Mundhöhle beeinflusst, zeigt aber große inter- und intraindividuelle Unterschiede (C. Hannig, Hannig, & Attin, 2005a). In Untersuchungen der Speichelzusammensetzung konnte festgestellt werden, dass submandibuläre und sublinguale Speicheldrüsen dreimal mehr Lysozym sezernieren, als die Glandula parotis, wogegen der Speichel aus der Parotis mehr α -Amylase enthält (C. Hannig, Hannig, & Attin, 2005a). In der Menge der α -Amylasesekretion besteht eine große intraindividuelle Variabilität. Die α -Amylase spaltet Polysaccharide zu höhermolekularen Polysaccharidbruchstücken (Dextrine). Zusätzlich bilden sie mit Mucin MG1 Komplexe, die wiederum für Pellikelvorläufer ein Reservoir darstellen (M. Hannig, Hess, Hoth-Hannig, & De Vrese, 2003). Trotzdem ist α -Amylase selbst ein Vorläufer der Pellikel. Amylase-sIGA-Komplexe sind Bindungsstellen für orale Streptokokken, die ein Amylase-Bindungsprotein-A-Gen besitzen, wie *Streptococcus sanguis* und *Streptococcus gordonii* (C. Hannig et al., 2009a; Vacca Smith & Bowen, 2000a). Die Aktivität der α -Amylase folgt der Michaelis-Menten-Kinetik.

Bakterielle Glycosyltransferasen wurden in den 3 Isoformen B, C und D in der Pellikel nachgewiesen (C. Hannig, Ruggeri, Al-Khayer, Schmitz, Spitzmüller, Deimling, et al., 2008a;

Einleitung

Vacca Smith, Venkitaraman, Schilling, & Bowen, 1996) und untersucht. Sie sind extrazelluläre Enzyme, die Glucane aus Disacchariden, vorwiegend Saccharose, synthetisieren und von *Streptococcus mutans* (Hamada & Slade, 1980; Loesche, 1986) und *Streptococcus sangius* stammen (Vacca Smith et al., 2000). Ihre Aktivität steigt kontinuierlich mit dem Pellikelwachstum an (Vacca Smith & Bowen, 2000a), auch dann, untersucht für GTF C und D, wenn sie sich in einem immobilen Status befinden, im Gegensatz zu Amylase oder Lysozym (C. Hannig, Hannig, & Attin, 2005a; C. Hannig, Ruggeri, Al-Khayer, Schmitz, Spitzmüller, Deimling, et al., 2008a; Vacca Smith et al., 1996). GTF B katalysiert die Synthese von wasserunlöslichen Glucanen, GTF D synthetisiert ein wasserlösliches Glucan und GTF C wasserlösliche und –unlösliche Glucanpolymere.

In einigen Studien (Lendenmann, Grogan, & Oppenheim, 2000; Ooshima, Yoshida, & Hamada, 1994b) wurde die Pellikel auf Proteine untersucht, die im Verdacht stehen, eine frühe Abwehrbarriere aufzubauen. Lactoferrin, sIGA, Lysozyme und Carboanhydrasen (I, II), bekannt für ihre antibakteriellen und puffernden Eigenschaften, wurden in einer in situ gebildeten Pellikelschicht detektiert (Lendenmann et al., 2000).

Peroxidase, ein Antioxidant, konnte als Speichelperoxidase und leukozytäre Myeloperoxidase aus Parodontalspaltsekret in der Pellikel nachgewiesen werden (C. Hannig et al., 2009a). Transglutaminase- und alkalische Phosphataseaktivitäten können in einem immobilen Status in der Pellikel bestätigt werden (C. Hannig, Spitzmüller, Hoth-Hannig, & Hannig, 2011). Transglutaminasen kommen in der Leber, Haut oder im Blut vor und katalysieren eine Acyl-Transfer-Reaktion. Diese Enzymaktivität ist ebenso auf der Oberfläche der oralen Mukosazellen präsent und sorgt für eine Vernetzung von sauren prolinreichen Proteinen, Histatin und Cystatin (Bradway, Bergey, Jones, & Levine, 1989; Bradway et al., 1992; Yao et al., 1999).

Die fest integrierten Enzyme in der Pellikel scheinen eine große Bedeutung für die innere Reifung der Pellikel zu haben, wobei sie bei der enzymatischen Vernetzung und Dephosphorylierung mehr im Vordergrund stehen, als bei der Proteolyse (C. Hannig, Spitzmüller, Miller, Hellwig, & Hannig, 2008c).

Einleitung

2.2.2 Funktion der Pellikel

Die erworbene Pellikel ist in der Lage, als Schmierfilm (Lubrikant) auf der Schmelzoberfläche zu fungieren und somit die Reibungskräfte zwischen benachbarten, antagonistischen Zahnoberflächen und zwischen Zahnoberflächen und Mukosa zu verringern. Berg *et al.* (I. C. Berg, Rutland, & Arnebrant, 2003) fanden heraus, dass der Friktionskoeffizient dabei um den Faktor 20 reduziert wird. Somit stellt die Pellikel eine wichtige Funktion für den Schluckakt, die Mastikation und für das Sprechen dar (Aguirre, Mendoza, Levine, Hatton, & Douglas, 1989; Tabak, Levine, Mandel, & Ellison, 1982). Verantwortlich dafür könnten sowohl Muzin-Glykoproteine (I und II) als auch Statherin (Douglas *et al.*, 1991; Ramasubbu, Thomas, Bhandary, & Levine, 1993; Tabak, 1995) sein, die aufgrund ihrer rheologischen Eigenschaften zur Schmierfunktion beitragen. Insgesamt gesehen steuert die Pellikel zusammen mit Speichel und Plaque einen Teil zum oralen Lubrikant bei. Außerdem hat die Präsenz des Lubrikants einen Einfluss darauf, wie viel der kinetischen Energie durch das Abscheren der intermolekularen Verbindungen im Lubrikant absorbiert und wie viel zum Zahn weitergeleitet wird (Mair, 1999). Der Lubrikationseffekt (I. C. Berg *et al.*, 2003) und die Widerstandsfähigkeit der adsorbierten Pellikel gegenüber der Reinigung durch Zahnpasta scheinen wichtige Faktoren für die Verringerung der Abrasionswirkung zu sein. In-situ-Studien von Pickles und Joiner (2008) ließen nach einem Zeitraum von mehreren Wochen zwischen verschiedenartig abrasiven Zahnpasten sowohl auf Schmelz als auch auf Dentin unter Pellikeleinfluss keine signifikanten Unterschiede mehr erkennen (Joiner *et al.*, 2008; Pickles, Joiner, Weader, Cooper, & Cox, 2005).

Mehr als durch ihre Viskosität wird die Pellikel durch ihre chemischen Eigenschaften in ihrer Wirksamkeit beeinflusst (Lambrechts, Debels, Van Landuyt, Peumans, & Van Meerbeek, 2006). Die Pufferkapazität von Speichel und Plaque ist wichtig für die Minimierung erosiver Attacken, während die Pellikel als Schutzschicht agieren könnte. Sie vermag die Diffusionsrate beispielsweise von Calcium- und Phosphat-Ionen sowie von Milchsäure zu reduzieren (B. L. Slomiany *et al.*, 1986; Zahradnik, Moreno, & Burke, 1976) und damit den Zahnschmelz vor Säureeinwirkung zu schützen. Die Pellikel ist für Wasser, kleine Ionen und Hydrogenperoxide eine semipermeable Schicht (Zahradnik *et al.*, 1976). Sie formiert sich als Barriere und Puffer gegen demineralisierende Stoffe, bietet ein Reservoir für remineralisierende Elektrolyte auf dem Zahnschmelz. Über die Diffusion von Calcium und Phosphat werden De- und Remineralisationsvorgänge gesteuert (Zahradnik *et al.*, 1976; Zahradnik, Propas, & Moreno, 1977; 1978). Die porenartige Oberflächenstruktur erlaubt es

Einleitung

der Pellikel, protektiv der Demineralisation durch mikrobielle Säuren und erosiven Herausforderungen entgegenzuwirken (Meurman & Frank, 1991; Zahradnik et al., 1976). Eine vollständige Inhibition von Demineralisationsprozessen ist durch eine in situ gebildete Pellikelschicht allerdings nicht möglich (M. Hannig et al., 2003; M. Hannig & Balz, 1999; 2001; M. Hannig, Döbert, Stigler, Müller, & Prokhorova, 2004b). TEM Studien von Hannig *et al.* haben gezeigt, dass sich die Pellikelformationen schrittweise von außen nach innen zur Basalschicht unter Kontakt mit säurehaltigen Agenzien auflösen (M. Hannig et al., 2003; M. Hannig & Balz, 1999; 2001). Dabei geht der locker formierte äußere Anteil der Pellikel zumeist gänzlich verloren, während die Basalschicht eine viel höhere Resistenz gegen Säuren aufweist und selbst im Kontakt mit 0,1% Zitronensäure nach fünf Minuten vollkommen intakt erscheint (Hannig und Balz, 1999; Hannig und Balz, 2001). In-vivo-Studien konnten belegen, dass selbst eine Kurzzeit-Pellikel von drei Minuten ähnlich einer 2h-Pellikel den Schmelz vor Zitronensäureattacken schützen kann (M. Hannig, Fiebiger, Güntzer, Döbert, Zimehl, & Nekrashevych, 2004c). Zusammenfassend kann man feststellen, dass eine Pellikel sowohl Diffusionsbarriere als auch semi-permeable Membran darstellen kann. Zwischen Erosionsschutz und Pellikeldicke besteht eine direkte Relation (Amaechi, Higham, Edgar, & Milosevic, 1999).

Auch die Akkumulation von Carbonanhydrase und deren reversible Katalyse des Kohlenstoffdioxids mit Wasser zu Proton und Hydrogencarbonat in der Pellikel kann durch die Neutralisation von Säuren einen Beitrag zum Schutz des Schmelzes vor Demineralisation leisten (Leinonen, Kivelä, Parkkila, Parkkila, & Rajaniemi, 1999).

Prolinreiche Proteine besitzen eine hohe Affinität zu Hydroxylapatit und sind ein obligater Bestandteil der Pellikel (Bennick et al., 1983; Kousvelari, Baratz, Burke, & Oppenheim, 1980). Sie inhibieren die Präzipitation von Kalziumsalzen an der Schmelzoberfläche und tragen somit direkt zur mineralischen Selbstregulation bei (Bennick, 1977).

Die Dentin-Pellikel bietet begrenzten Schutz gegen erosive Herausforderungen und fungiert weniger als Barriere, sondern eher als ein permeables Netzwerk für Ionen (C. Hannig et al., 2004a).

Die Lipidmenge und Zusammensetzung in der Pellikel könnte einen Einfluss auf die Kariesaktivität nehmen. Gegen Säureangriffe scheinen die hydrophoben Lipide eine Schutzschicht bilden zu können. Schon frühzeitig wurde vermutet, dass ein intaktes „exogenes Zahnoberhäutchen“ kariesprotektive Eigenschaften besitzt (Bössmann & Hoppe, 1974; Hoppe & Bössmann, 1968; Juriaanse, 1979; Meckel, 1965; 1968; B. L. Slomiany et al., 1986; Q. T. Smith, 1980; Zahradnik et al., 1976). Zahradnik *et al.* zeigten durch ihre

Einleitung

Untersuchungen, dass ein sieben Tage altes Zahnoberhäutchen eine Diffusionshemmung von mehrfach geladenen Ionen und damit einen Schutz des Zahnschmelzes vor Demineralisation ausbildet (Zahradnik et al., 1976). Allerdings fungiert die Pellikel nicht nur als eine physiologische Schutzschicht für den Zahn, sondern stellt gleichzeitig auch die Basis für die bakterielle Adhärenz und Biofilmbildung auf der Zahnoberfläche dar. Innerhalb von Minuten wird die pellikelbedeckte Zahnoberfläche von Mikroorganismen, vornehmlich Streptokokken besiedelt (Cassels et al., 1995; Saxton, 1973). Adhäsine der Bakterien interagieren mit Rezeptoren der Pellikel, Rezeptoren anderer Bakterien, Glykolipiden oder extrazellulären Proteinen wie Kollagenen und Fibrinogen (Jenkinson & Lamont, 1997; Liljemark & Bloomquist, 1996; Marsh, 1999; Scannapieco, 1994).

Die Ernährung kann einen Einfluss auf die Zusammensetzung und Funktion der Pellikel nehmen. Polyphenole aus Tee und Wein inaktivieren die Peroxidase der Pellikel irreversibel bis zur Neubildung. Beispielsweise haben Carpenter *et al.* im Zusammenhang mit der Frage, welchen Einfluss Tee auf eine Chlorhexidin-Spülung ausübt, festgestellt, dass beide in Kombination verabreicht eine höhere Bindungsaffinität zu Hydroxylapatit aufweisen (Carpenter, Pramanik, & Proctor, 2005). Joiner *et al.* bestätigen durch ihre ellipsometrischen Studien die bessere Anbindung von CHX in Kombination mit schwarzem Tee und macht dafür die elektrostatischen Anziehungskräfte zwischen adsorbiertem kationischen Chlorhexidin und den negativ geladenen Tee-Komponenten verantwortlich (Joiner, Elofsson, & Arnebrant, 2006). Polyphenole reduzieren die Produktion von Säureverbindungen und die Möglichkeit der Streptokokken, wasserunlösliche Glukane aus Saccharose zu synthetisieren (Hattori, Kusumoto, Namba, Ishigami, & Hara, 1990; Matsumoto et al., 1999; Ooshima, Minami, Aono, Tamura, & Hamada, 1994a; Ooshima, Yoshida, & Hamada, 1994b). So konnte bereits in einigen Untersuchungen die reduzierte Kolonisation der Zahnoberfläche mit Mikroorganismen, insbesondere die reduzierte Anheftung von *Streptococcus mutans* unter dem Einfluss von Polyphenolen beobachtet werden (Ferrazzano, Amato, Ingenito, De Natale, & Pollio, 2009; Hamilton-Miller, 2001; Hattori et al., 1990; Rasheed & Haider, 1998; Rosen, Elvin-Lewis, Beck, & Beck, 1984; Hannig et al., 2008a, 2009b).

Die prolinreichen Proteine im Speichel stehen im Verdacht, die Polyphenole des Rotweines und des schwarzen Tees stärker an Hydroxylapatit zu binden (Joiner, Muller, Elofsson, Malmsten, & Arnebrant, 2003; Proctor, Pramanik, Carpenter, & Rees, 2005).

In einer In-situ-Studie (Hooper et al., 2003) wurde der Einfluss von erosiven Getränken (Orangensaft) auf die Abrasion auf Schmelz und Dentin untersucht. Das Ergebnis war eine

Einleitung

höhere Anfälligkeit auf den Zahnpastenabrieb, insbesondere des Dentins, was die Vermutung bestätigt, dass das protektive Potenzial der Pellikel auf Schmelz und Dentin durch Säure beeinträchtigt wird. Ähnlich bestätigen andere Autoren den Zusammenhang zwischen Abrasion und Erosion. Speichel und die Pellikel können zwar durch Remineralisierung den Verschleiß beeinflussen, aber nicht verhindern (C. Hannig et al., 2007; Jaeggi & Lussi, 1999; Shellis & Addy, 2014).

Der Konsum von Milchprodukten (Vacca Smith & Bowen, 2000b), Sorbitol oder Xylitol hat einen Einfluss auf die Pellikelformation und –reifung. Dabei wird die Inkorporation von Milchproteinen und Casein im Austausch mit Albumin herbeigeführt (Schüpbach, Neeser, Golliard, Rouvet, & Guggenheim, 1996).

2.3 Ätiologie von Abrasionen

2.3.1 *Abrasion*

Als Abrasion bezeichnet man den Verlust der Zahnhartsubstanz verursacht durch Nahrung (Demastikation), Aufnahme von Feinstaubpartikeln in der Umgebungsluft und durch Mundhygienemaßnahmen, beispielsweise durch stark abrasive Substanzen sowie falsche Zahnputztechniken. Hiervon betroffen sind sowohl Kauflächen als auch Inzisalkanten und Bereiche am Übergang der Zahnkrone in den Wurzelbereich, die sogenannte Schmelz-Zement-Grenze.

2.3.2 *Attrition*

Der Abrieb von Zahnhartsubstanzen durch direkten Kontakt antagonistischer oder benachbarter Zahnflächen nennt man Attrition.

Ursachen dafür können Parafunktionen, Bruxismus, neuromuskuläre Störungen im Kieferbereich und Stellungsanomalien von Zähnen sein. Festzustellen sind diese Erscheinungen klinisch anhand von Schliffacetten zwischen den jeweiligen Antagonisten.

Treffen Zähne aufeinander, werden mikroskopisch gesehen unebene Oberflächen geglättet.

Einleitung

Während sich diese Unebenheiten unter der Kraft des Aufeinanderzubewegens als Folge ihrer Festigkeit deformieren oder frakturieren, kann der Effekt über die Zeit als Verschleiß registriert werden. Die Attrition ist somit das Resultat von sich annähernden Oberflächen und ist vorwiegend physiologisch anzusehen. Die Verschleißrate von Schmelz in okklusalen Kontaktflächen kann bis zu 41 µm im Jahr betragen (Lambrechts, Braem, Vuylsteke-Wauters, & Vanherle, 1989).

2.3.3 Keilförmige Defekte

Der keilförmige Defekt ist meist im labialen/bukkalen zervikalen Bereich der Zähne und somit in unmittelbarer Nähe der Schmelz-Zement-Grenze lokalisiert.

Als Ursache dieser dreiecksförmigen glatten Einkerbungen werden mechanisch-abrasive Vorgänge, wie falsche Zahnputztechnik, stark abrasive Zahnpasta oder bereits bestehende Erosionen und inaktive, kariöse Läsionen herangezogen. Zusätzlich können Parafunktionen wie Pressen, Knirschen und Fehlstellungen zu Schmelzaussprengungen führen.

2.4 Zahnpasten

Zahnpasten tragen zur Säuberung und Politur der Zahnoberfläche bei. Sie entfernen zusammen mit einer Zahnbürste Plaque und enthalten pharmakologisch wirksame Substanzen.

In der Zahnpasta lassen sich 15-55% Abrasivstoffe finden. Diese sind Carbonate, Phosphate (Dicalciumphosphat DCP), Dicalciumphosphat-Dihydrat (DCPD), Natriummetaphosphat (IMP), Kieselgele, feindisperse Kieselsäure, Aluminiumoxidhydrate und Kunststoffe.

Bakterienbeläge können selbst ohne Abrasivstoffe allein durch Zahnbürsten und künstlichen Speichel entfernt werden, so dass eine vollständige Pellikel erhalten werden kann (Hay, 1967; Leach, 1967; Mayhall, 1975; Tinanoff, Wei, & Parkins, 1974). Doch auch „eine vollständige Entfernung des exogenen Zahnoberhäutchens beim Zähneputzen selbst mit sehr abrasiv wirkenden Pasten und geringer Verdünnung (kann) ausgeschlossen“ werden (M. Hannig & Bössmann, 1988a).

Hotz hat in Untersuchungen auf bovinem Dentin herausgefunden, dass in jedem Falle ein Substanzverlust bei Verwendung von Zahnpasten eintritt, der aber stark von Anpressdruck der

Einleitung

Zahnbürste und Verdünnung des Zahnpastengemisches abhängig scheint (Hotz, 1983). Es wurde festgestellt, dass eine Veränderung der Verdünnung von 1:2 auf 1:4 (Paste:Flüssigkeit, Volumen) die Abrasivität um etwa 50% reduziert wird. Eine Verdoppelung des Auflagegewichtes der Zahnbürsten von 20g auf 40g bewirkte eine direkt proportionale Steigerung der Abrasionswirkung.

RDA- bzw. REA-Werte einer Zahnpasta spiegeln wissenschaftlich anerkannt ihren zu erwartenden Abrasivitätscharakter auf Dentin und Schmelz wieder. Die Methode zur Bestimmung der individuellen Abrasivität wurde von Hefferen *et al.* entwickelt (Hefferen, 1976). Die Abrasivität einer Zahnpasta kann in vitro mittels Abtrages von radioaktivem Dentin oder Schmelz untersucht werden. Dies geschieht innerhalb eines festgelegten Putzprotokolls und im Vergleich zu einer bereits bekannten Standardabrasivität.

2.5 Polyphenole

2.5.1 Definition Phenol

Polyphenole werden als sekundäre Pflanzenstoffe bezeichnet, da sie weder im Primärstoffwechsel der Pflanze gebildet noch verbraucht werden.

Die Grundstruktur, das Phenol, besteht aus einem Benzolring und einer Hydroxylgruppe (Abb.1).

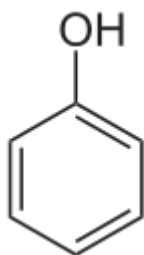


Abb.1: Phenol

Polyphenole sind aromatische Verbindungen mit mehr als einer an den aromatischen Ring (Benzolring) gebundenen Hydroxylgruppe. Natürliche Polyphenole kommen in Pflanzen als bioaktive Substanzen in Form von Farbstoffen (Flavonoide, Anthocyane), Geschmacksstoffe und Gerbsäuren (Tannine) vor. Sie spielen eine wichtige Rolle beim Schutz vor Fraßfeinden und bei der Fortpflanzung.

Einleitung

2.5.2 Unterteilung der Polyphenole

Die wichtigsten Polyphenole werden unterteilt in Flavonoide, Hydroxyzimtsäuren und Hydroxybenzoesäuren (Watzl & Rechkemmer, 2001; 2002) (*Abb.2*).

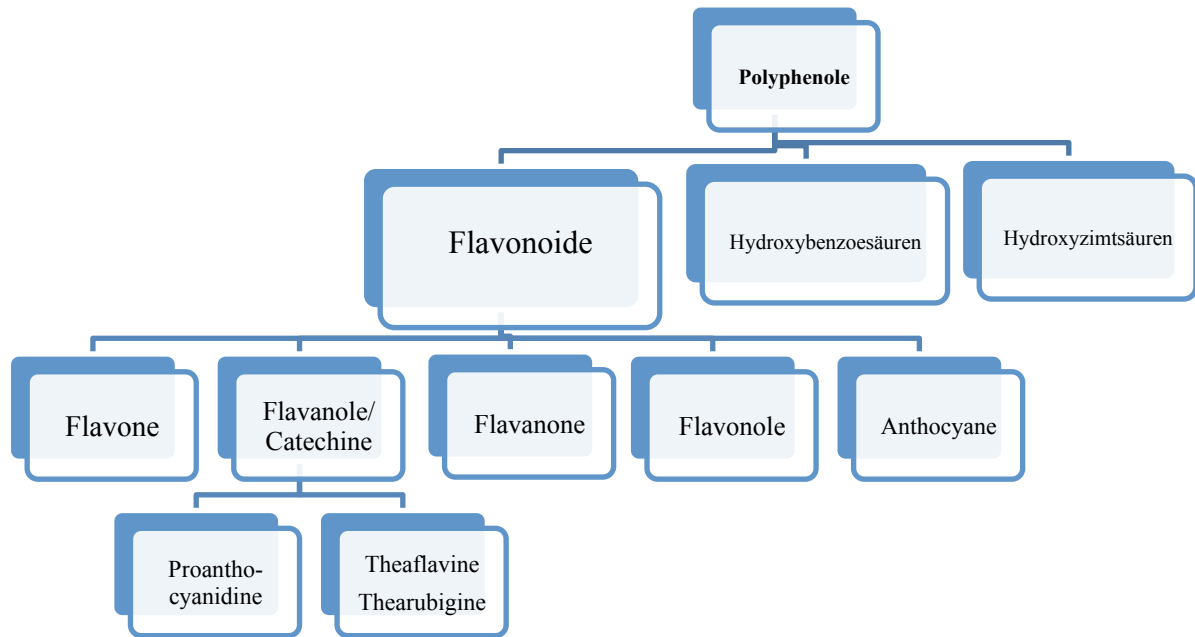


Abb.2: Polyphenole und einige Untergruppen (Engelhardt, 1995)

Die Flavonoide (lat.: flavus=gelb) sind die in der Natur am häufigsten vorkommenden Polyphenole, begründet durch die Modifikationen des Grundgerüsts. Der Grundkörper ist ein Phenylpropanderivat (Harborne & Williams, 2000) (*Abb.3*).

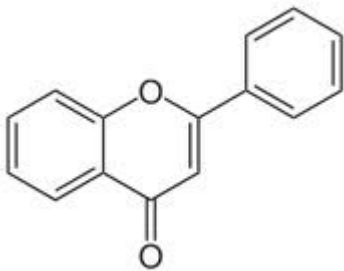


Abb.3: Flavonoid

Einleitung

Grundsätzlich bestehen Flavonoide aus 3 Kohlenstoffringen mit 2 aromatischen sowie einem O-heterozyklischen Ring. Durch den Ersatz von Hydroxyl- oder Methoxylgruppen in den Benzolringen, durch eine Verknüpfung der Hydroxylgruppen mit einem Zucker bzw. Phosphat oder durch Variationen am Pyranring können Derivate gebildet werden. In der Natur treten Flavonoide meist nicht frei in Form ihres Aglykons auf, sondern liegen glykolysiert gebunden vor (Harborne & Williams, 2001). Die Glykolysierung trägt dazu bei, dass sich ihre Löslichkeit im Pflanzensaft erhöht und sie Flavonoide gegenüber UV-bedingtem enzymatischem Abbau stabilisieren (Aherne & O'Brien, 2002). Der Gehalt an Flavonoiden schwankt je nach Pflanzensorte und Klima, wobei sich die Flavonoide überwiegend in den Randschichten von Pflanzen sowie den äußeren Blättern befinden. Als zellsaftlösliche Pigmente verleihen sie bestimmten Pflanzenteilen (z. B. Blüten oder Früchten) ihre charakteristische Farbe (Harborne & Williams, 2000). Weiterhin schützen sie die Pflanze vor Fressfeinden und dem Befall durch Pathogene. Eine Ausnahme bilden lediglich die Flavan-3-ole, die in der Natur hauptsächlich als Aglyka vorkommen. Die Aglyka der Flavonoide werden von Watzl nach dem Oxidationsgrad ihres zentralen Pyranrings (C) in folgende Substanzklassen unterteilt (Watzl & Rechkemmer, 2001):

- Flavonole
- Isoflavone
- Flavanone
- Flavone
- Anthocyanidine
- Flavan-3-ole (Catechine, Procyanidine).

Substanzen der einzelnen Flavonoidklassen unterscheiden sich sowohl in Anzahl an Hydroxy- und Methoxysubstituenten als auch in Art, Anzahl und Anordnung der nicht-acylierten und acylierten Zuckerreste. Durch diese strukturelle Vielfalt sind derzeit über 5000 verschiedene Flavonoide beschrieben (Harborne & Williams, 2000; Williamson, Plumb, & Garcia-Conesa, 1999). Die Biosynthese von Flavonoiden erfolgt durch stufenweise Kondensation der aromatischen Aminosäure Phenylalanin mit drei aktivierten Malonsäuren. Hierbei entstehen durch 1,6-Cyclisierung zunächst die Chalkone, aus denen durch Folgereaktionen (u.a.

Einleitung

Hydroxylierungen) die nachfolgenden Flavonoide gebildet werden.

Aufgrund epidemiologischer Studien wie z. B. der „Zutphen-Elderly“-Studie (Hertog, Feskens, Hollman, Katan, & Kromhout, 1993a) oder der „Finnish Mobile Clinic“-Studie (Knekt, Jarvinen, Reunanen, & Maatela, 1996; Knekt et al., 2002) werden Flavonoiden aus Früchten und Gemüse mit positiven ernährungsphysiologischen Eigenschaften in Verbindung gebracht (Erlund, Alfthan, Mäenpää, & Aro, 2001a; Erlund et al., 2000; Erlund, Meririnne, Alfthan, & Aro, 2001b). So werden ihnen antikanzerogene, antioxidative, antivirale, antimikrobielle, anti-atherogene, antiinflammatorische, antiallergene immunstimulierende und zellprotektive Wirkungen zugesprochen (da Silva, Abdalla, & Terao, 2000; Hertog et al., 1993a; Hertog, Hollman, Katan, & Kromhout, 1993b; Manach, Williamson, Morand, Scalbert, & Rémésy, 2005; Paganga, Miller, & Rice-Evans, 1999; Rice-Evans & Miller, 1996; Rice-Evans, Miller, & Paganga, 1996; Scalbert & Williamson, 2000; Williamson et al., 1999). Im Wesentlichen beruhen die gesundheitsförderlichen Eigenschaften jedoch auf dem Einfang freier Radikale und zeichnen sich durch folgende Strukturmerkmale aus (Bors & Michel, 1999; Bors, Heller, Michel, & Saran, 1990b; 1990a):

- o-Dihydroxystruktur (Catecholstruktur) im B-Ring für den Radikalangriff
- Doppelbindung in Position 2,3 in Kombination mit einer 4-oxo-Gruppe für eine effiziente Elektronendelokalisation zur Stabilisierung des Flavonoidradikals
- Gleichzeitige Anwesenheit einer 3'-OH und einer 4'-OH-Gruppe ebenfalls zur Erhöhung der Stabilität des Flavonoidradikals.

Die meist gelben Flavonole besitzen jeweils als Grundkörper ein Flavan, das an C4-Position eine Oxo-Gruppe trägt und in C3-Stellung hydroxyliert ist. Aufgrund ihrer gelben Färbung sind sie bedeutende Farbstoffe zahlreicher heimischer Obst- und Gemüsearten (Manach et al., 2005). Die hellgelben Flavonolglykoside sind hauptsächlich in der Schale von Obst und Gemüse anzutreffen, da ihre Bildung lichtabhängig ist. Das wichtigste Aglykon der Flavonolglykoside in Früchten ist das Quercetin (*Abb.4*).

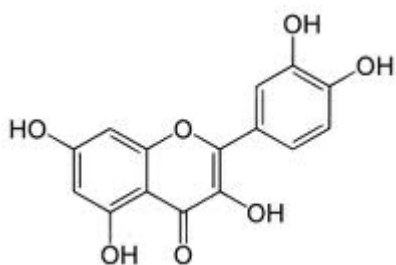


Abb.4: Quercetin

Einleitung

Die Catechine (Flavan-3-ole) sind als hydrierte Flavone aufzufassen und gehören zu einer Gruppe farbloser Verbindungen. Als (+)-Catechin nehmen sie eine [2R, 3S]-Konformation ein (*Abb.5*) und als (-)-Epicatechin eine [2S, 3S]-Konformation. Sie kommen in allen heimischen Früchten vor und bilden die Grundstruktur einer Reihe natürlicher Gerbstoffe (zum Beispiel im grünem Tee) (Scalbert & Williamson, 2000).

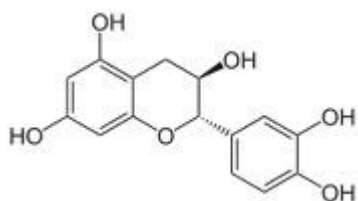


Abb.5: Catechin

Catechine, die als Di-, Oligo- oder Polymere des (+)-Catechin und des (-)-Epicatechin auftreten, werden als Procyanidine bezeichnet. Procyanidine unterscheiden sich von den meisten anderen Polyphenolen durch ihre oligomere beziehungsweise polymere Struktur und ihr hohes Molekulargewicht (*Abb.6*).

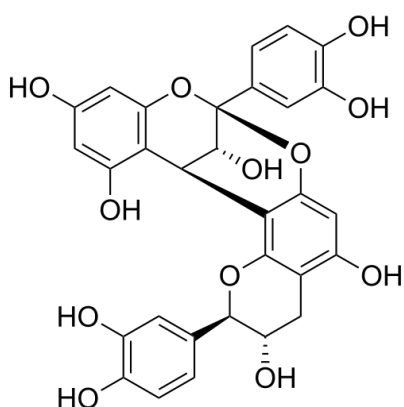


Abb.6: Proanthocyanidin

Die häufig verwendete Bezeichnung Proanthocyanidin leitet sich von der Eigenschaft ab, dass die Procyanidine bei Erhitzung mit Säuren und in Anwesenheit von Sauerstoff in die entsprechenden Anthocyanidine übergehen (Haslam, 1996).

Die häufigsten Verknüpfungen monomerer Flavanole zu dimeren, oligomeren und polymeren Procyanidinen werden zwischen C4 und C8 gebildet, wobei zusätzlich zwischen den Stereoisomeren α oder β unterschieden wird.

Die vielen Kombinationsmöglichkeiten der Procyanidine durch Verknüpfung, Stereochemie und dem Grad der Oligo- bzw. Polymerisierung unterliegen einer großen strukturellen Vielfalt

Einleitung

(Peng, Dixon, Muga, Smith, & Wargovich, 2006a; Peng, Wargovich, & Dixon, 2006b). Infolge der zahlreichen Hydroxygruppen besitzen die Procyanidine gerbende Eigenschaften. Procyanidine kommen in Früchten, Rinde, Blättern und Samen vieler Pflanzen vor und treten dadurch auch in verarbeiteten Nahrungsmitteln wie Fruchtsäften, Wein, Bier, Tee und Kaffee auf.

Die Gruppe der Phenolcarbonsäuren befinden sich überwiegend in den Randschichten von Pflanzen. Sie tragen zur Stabilisierung der Zellwände in der Schale bei. Die Phenolcarbonsäuren stellen sich als Beispiel der einfachen Phenole dar. Sie lassen sich weiter in die Gruppe der Hydroxybenzoesäure mit einem C1-C6 Grundkörper und der Hydroxyzimtsäure mit einem C3-C6 Grundkörper unterteilen: Gallussäure, Vanillinsäure und Protocatechusäure als Beispiel für Hydroxybenzoesäurederivate und Kaffesäure, p-Cumarsäure und Chlorogensäure als Beispiel für Hydroxyzimtsäurederivate.

2.5.3 Teepolyphenole

Teepolyphenole, insbesondere die Flavonoide, erwecken großes Interesse aufgrund ihrer gesundheitsfördernden Eigenschaften. Diese wurden zusammengefasst in einer Reihe von Übersichtsarbeiten (Beecher, Warden, & Merken, 1999; K. A. Cooper et al., 2007; Knekt et al., 1996; 2002; Kobayashi et al., 2009; Kuo, 1997; Lichtenthäler et al., 2005; Manning & Roberts, 2003).

Bezogen auf das Trockengewicht enthalten frische Teeblätter bis zu 30% Polyphenole (Kiehne & Engelhardt, 1996a; 1996b). Die wichtigsten Teepolyphenole sind die Catechine, Flavonol-O-glykoside, Flavonol-C-glykoside, Proanthocyanidine und im schwarzen Tee auch Theaflavine und Thearubigine, welche aus den Catechinen während der Fermentation entstehen. Während der Fermentation werden meist mehr als 80% der Flavanoide unter Einwirkung der Polyphenoloxidase oxidiert. Dadurch werden die charakteristischen Schwarzteekomponenten gebildet wie z.B. Theaflavine, Theaflavinsäuren, Theaflagalline und Bisflavanoide. Dementsprechend hat die Zusammensetzung der Catechin-Fraktion einen signifikanten Einfluss auf die gebildeten Fermentationsprodukte und folglich auch auf die Qualität des schwarzen Tees.

Die Proanthocyanidine (kondensierte Tannine) sind Dimere, Oligomere und Polymere der Flavan-3-ole, die durch enzymatische oder chemische Kondensation der Flavan-3-ol-Grundeinheiten entstehen.

Einleitung

Als kondensierte Gerbstoffe tragen Proanthocyanidine zu kritischen Eigenschaften wie Farbe, Stabilität, Herbheit und Bitterkeit der Pflanze oder daraus gewonnenen Lebensmitteln und Getränken wie Wein und Tee bei. Bei geringem Polymerisationsgrad sind sie farblos und haben einen bitteren Geschmack. Erst bei höherem Polymerisationsgrad entsteht eine gelbliche bis braune Farbe. Weiterhin haben Proanthocyanidine einen positiven Einfluss auf die menschliche Gesundheit aufgrund des Schutzes gegen freie Radikale, Verletzungen und Herz-Kreislauf-Erkrankungen (Bagchi et al., 2003; Cos et al., 2004). Tannine sind wasserlösliche Polyphenole, die in vielen Pflanzen präsent sind. Durch sie konnte bereits eine Reduktion der Mutagenaktivität festgestellt werden. Einige Karzinogene und oder Mutagene produzieren oxygenfreie Radikale für die Interaktion mit zellulären Makromolekülen. Das antikarzinogene und antimutagene Potential der Tannine könnte in Beziehung stehen zu ihrer antioxidativen Eigenschaft, welche wichtig ist, um vor zellulärem oxidativem Schaden zu schützen, einschließlich der Lipid-Peroxidation. Tannine wirken antimikrobiell. Sie beeinträchtigen das Wachstum vieler Pilze, Hefen, Bakterien und Viren. Somit schützen sie die Früchte vor mikrobieller Infektion. Dies ist ein natürlicher Schutzmechanismus (Chung, Wong, Wei, Huang, & Lin, 1998).

2.5.4 Physiologische Wirkungen des Tees

Die gesundheitlichen Wirkungen des Tees bzw. seiner Polyphenole hängen von seiner jeweiligen Aufnahme und Bioverfügbarkeit ab, die stark variieren können.

Zahlreiche Studien zeigten, dass Tee (insbesondere grüner Tee) vor einer Reihe von Krebsarten, wie Lungen-, Prostata-, Brust-, Magen- und Hautkrebs schützt (Carlson, Bauer, Vincent, Limburg, & Wilson, 2007; Formica & Regelson, 1995; Graf, Milbury, & Blumberg, 2005; Kuntz, Wenzel, & Daniel, 1999). Andere Studien weisen darauf hin, dass weißer wie grüner Tee eine Hemmung auf Darmkrebs-Erreger in Mäusen, wie Darmpolypen (W.-M. Dashwood, Orner, & Dashwood, 2002; Wang et al., 2008) und auf die Zellvermehrung dieser Krebs-Erreger hervorrufen (Carter et al., 2007).

Darüber hinaus konnten einige Untersuchungen eine Verknüpfung zwischen der Tee-Polyphenolaufnahme und dem späterem Auftreten von verschiedenen Krankheiten, wie Alzheimer- und Parkinsonkrankheit (Guo, Bezard, & Zhao, 2005; Guo et al., 2007; Zhao, 2009) und Asthma (Allan & Devereux, 2011; Bani et al., 2006; Fraňová et al., 2011; Garcia, Arts, Sterne, Thompson, & Shaheen, 2005; Jung et al., 2009; Marwick, Ito, Adcock, & Kirkham, 2007) herstellen. Klinische Studien zeigten, dass Tee den Fettstoffwechsel verbessert, die

Einleitung

Fettverbrennung beschleunigt und die Insulinsensitivität erhöht (Dulloo, Seydoux, Girardier, Chantre, & Vandermander, 2000; Venables, Hulston, Cox, & Jeukendrup, 2008) und somit das Risiko des Typ-2-Diabetes senken kann (Iso et al., 2006; Knekt et al., 2002).

Nach Angaben der Literatur besitzen Tees, insbesondere ihre Flavonolglykoside, schützende Wirkung gegen Arteriosklerose und Herz-Kreislauf-Erkrankungen wie Myokard-Infarkt und Schlaganfälle (Halliwell, 1994; Hertog et al., 1993a; Keli, Hertog, Feskens, & Kromhout, 1996; Knekt et al., 1996).

Polyphenole sollen antientzündlich (Formica & Regelson, 1995) antihypertensiv, antiarrhythmisch und antiviral durch Hemmung der Transkriptase (Ielpo et al., 2000) sowie immunstärkend (Santana-Rios, Orner, Xu, Izquierdo-Pulido, & Dashwood, 2001) wirken.

Bei all diesen hervorzuhebenden positiven Effekten der Polyphenole sollte jedoch berücksichtigt werden, dass die beschriebenen gesundheitlichen Aspekte nicht nur einer Substanz oder einer Substanzgruppe zugeschrieben werden können. Weitere Effekte wie die unterschiedlichen Ernährungs- und Lebensumstände sind sicherlich auch zu berücksichtigen.

In Studien konnte ein antioxidativer Effekt des schwarzen Tees nachgewiesen werden, insbesondere bei Theaflavinen, Thearubiginen sowie bei Catechinen, indem sie die freie Radikalvermehrung inhibieren, freie Radikale einfangen und mit Metallionen ein Chelat bilden. Die Aktivität von Transkriptionsfaktoren wie Nf-kappaB oder AP-1 beeinflussen sie ebenso. Theaflavine unterdrücken die Aktivität von prooxidierenden Enzymen wie Xanthinoxidase oder Nitratoxidsynthase (Łuczaj & Skrzydlewska, 2005).

Nach Droebner und Erhardt sollen sich Polyphenole negativ auf die Aktivität des hochpathogenen Influenza-A-Virus auswirken (Droebner, Ehrhardt, Poetter, Ludwig, & Planz, 2007; Ehrhardt et al., 2007).

Auch zahnmedizinisch besteht ein erhöhtes Interesse an der Wirkung von Polyphenolen.

Ein antikariogener Effekt konnte in einer Studie (Otake, Makimura, Kuroki, Nishihara, & Hirasawa, 1991) mit Hilfe von Sunphenon an Ratten nachgewiesen werden. Spezielle pathogenfreie Ratten, die mit *Streptococcus mutans* infiziert und mit kariogenem Futter gefüttert wurden, welches Polyphenole enthielt, entwickelten weniger kariöse Läsionen als die Kontrollgruppe.

Doch nicht nur *Streptococcus mutans* (Smullen, Koutsou, Foster, Zumbé, & Storey, 2007), sondern auch *Escherichia coli* und *Streptococcus salivarius* sollen durch Extrakte aus dem grünen Tee inhibiert werden (Rasheed & Haider, 1998). Hannig *et al.* 2008 untersuchten die Aktivität von Amylase, Lysozym, Glykosyltransferasen und Peroxidasen immobilisiert in einer Pellikelschicht nach Behandlung mit Cistus-Tee über zehn Minuten (C. Hannig,

Einleitung

Spitzmüller, Al-Ahmad, & Hannig, 2008a). Dabei konnte festgestellt werden, dass sich die Bakterienmenge in einer 120 min-Pellikelschicht signifikant reduziert hatte. Die Aktivität von Lysozym, Amylase und Glykosyltransferase in der Pellicel war hingegen nicht beeinflusst worden. Jedoch war die Peroxidase-Aktivität signifikant reduziert.

Neben Tee wurden auch Kakao und Kaffee auf antibakterielle Eigenschaften (Ferrazzano et al., 2009) untersucht, und auch hier scheint sich eine Effektivität gegen die Adhäsion von Bakterien an der Zahnoberfläche herauszukristallisieren.

Li *et al.* fanden keine Hinweise auf einen Einfluss der Polyphenole auf die De- und Remineralisation von Schmelzoberflächen (Li et al., 2004b).

2.6 Fragestellung

Eine Vielzahl von Untersuchungen bestätigen der Pellicel protektive Eigenschaften. Dazu gehören neben einer lubrikativen (I. C. Berg et al., 2003; Dawes, 2008) und säureprotektiven Wirkung (Attin et al., 2004) auch der Schutz vor abrasiven Agenzien. Im Zusammenhang mit Polyphenolen konnte bereits in ellipsometrischen (Joiner et al., 2003; 2006; Joiner, Muller, Eloffson, & Arnebrant, 2004a) Studien eine Modifikation der Pellicel dargestellt werden, die den Anlass gaben, die Effekte von Polyphenolen weitergehend zu untersuchen.

Die Frage nach klinischer Relevanz der generierten Daten und ihre Übertragbarkeit auf die In-vivo-Situation wurde jedoch nicht beantwortet, da bisher vorrangig In-vitro-Methoden zur Untersuchung der Pellicelschicht in Bezug auf ihre Abrasionsresistenz genutzt worden waren. Das Ziel dieser Studie war es, eine In-vitro-Pellicel einer In-situ-Pellicel innerhalb einer Versuchsreihe gegenüber zu stellen und damit die Schmelz-Dentin-Abrasion zweier Zahnpasten unterschiedlicher Abrasivität zu untersuchen. Dabei wurde zugleich ein Teil der Pellicel mit Polyphenolen des schwarzen Tee's über zwei verschieden definierte Zeiträume kontaktiert. Desweiteren galt es zu klären, welchen Einfluss die Polyphenole des schwarzen Tee's auf die Pellicel hinsichtlich ihrer Abrasionsresistenz entwickeln können und welcher Nutzen daraus für die Prävention vor Zahnhartsubstanzverlust entsteht.

3 Material und Methode

3.1 Studiendesign

Die vorliegende Untersuchung wurde als experimentelle Studie durchgeführt. Ziel war ein Vergleich der Abrasion von humanen Schmelz-Dentin-Proben (n=196) nach Verwendung von zwei verschiedenen abrasiven Zahnpasten (RDA-Wert 90 und 204). Neben einer Kontrollgruppe ohne Pellikelauflagerung (n=40) sollten die Schmelz-Dentin-Proben eine in vitro (n=40) oder in situ (n=36) gebildete Pellikel aufweisen. Weiterhin sollte der Einfluss von Schwarztee auf die Abrasion untersucht werden. Die Tiefenunterschiedsmessungen zur Beurteilung der Abrasion auf Schmelzarealen sollten mit Hilfe des optischen Systems des Mikrohärte-Messgerätes (Mitutoyo HM-122) vorgenommen werden. Der Dentinabtrag sollte mittels Interferenzmikroskopie (NewView 100, Zygo Corp., Middlefield, CT, USA) ermittelt werden. Zusätzlich erfolgte eine ultrastrukturelle Untersuchung der Dentinoberflächen mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie.

Die Untersuchungen erfolgten in enger Kooperation mit Unilever Oral Care (Bebington, Wirral, UK). Das Studiendesign wurde von Unilever der lokalen Ethik-Kommission in Port Sunlight (UK) zur Prüfung vorgelegt und positiv beschieden.

3.2 Herstellung der Schmelz-Dentin-Proben

Schmelz-Dentin-Proben (3,5 x 3,5 x 2 mm) wurden aus extrahierten humanen Zähnen (zuvor in 0,1 % Thymol Lösung gelagert) herausgeschnitten, geschmirgelt und poliert bis zur Körnung 4000 plus Diamant Suspension (0,25µm). Die Lagerung erfolgte in Pufferlösung (Sörensen's Phosphat Puffer pH 7,2-7,4) bis zur weiteren Verwendung.

3.3 Vorbehandlung der Schmelz-Dentin-Proben

Auf einem Teil der Schmelz-Dentin-Proben wurden auf der Schmelzoberfläche mit einem Knoop Diamanten (Mitutoyo HM-122 Microhardness Testing Machine, Kawasaki, Japan) „Kerben“ (Impressionen) erzeugt.

Pro ausgewählte Probe wurden vier individuelle Eindrücke aufgebracht und die Kantenlängen

Material und Methode

ausgemessen.

Der Schmierfilm wurde durch eine zehnminütige Behandlung im Ultraschallbad mit Phosphat-Puffer (2 ml) entfernt, gefolgt von einer einminütigen Spülung in 2%iger Natrium-Hypochlorit-Lösung (2 ml). Danach wurden die Proben 3x für 5 Minuten mit Pufferlösung (2 ml) gespült und für 10 Minuten in 70%iger Ethanollösung gelagert. Abschließend wurden die Proben 2 x für 5 Minuten wiederholt mit Pufferlösung gespült (2 ml). Die Probenlagerung erfolgte in 3 ml Pufferlösung.

Die Proben wurden mit Hilfe von Polysiloxanmaterial (President Plus regular body, Coltene Whaledent, Schweiz) zu je zwei Stück in Mulden eines Containers (circa 1 cm Durchmesser) der Zahnputzmaschine eingebettet.

Die Zahnputzmaschine, ein Selbstbau der Firma Unilever, bestand aus einer Haltevorrichtung für zwei Container, die mit je zwei Schmelz-Dentin-Proben gleichzeitig belegt werden können. Über jedem Container wurde ein Zahnbürstenkopf mit Hilfe eines schwenkbaren Armes justiert. Nach dem Befüllen der Container mit den in Polysiloxan eingebetteten Schmelz-Dentin-Proben und der Zahnpastenmischung (EU-Signal oder CH-Signal) wurden die Bürstenköpfe linear reziprok motorgesteuert bewegt.

Die Schmelz-Dentin-Grenze wurde in Richtung der linearen reziproken Putzbewegung ausgerichtet. Die Polysiloxanabformungen waren wie die Proben an sich herausnehmbar.

Die Zahnbürste hatte einen flachen ebenmäßigen Schnitt (Bürstenhaar-Durchmesser 0,2 mm, Bürstenhaarlänge 12 mm), und auf den Bürstenkopf wirkte ein Gewicht von 300 g (± 5 g). Die Bürstgeschwindigkeit betrug 25 Vor- und Rückwärtsbewegungen in 10 Sekunden auf einer Distanz von circa 5 cm.

3.4 Zahnpasta Mischung

Die verwendeten Zahnpasten waren European (EU) Signal (0,32% Natriumfluorid, hydrated silica, Elida Fabergé, UK) und Chinese (CH) Signal (Kalziumkarbonat, Elida Fabergé, UK).

Diese wurden mit Polymer Lösung (1% Natrium-Carboxymethyl-Zellulose) und Pufferlösung in einer Gewichtsrelation von 1:1:1 gemischt und 1 Stunde vor ihrer Verwendung angesetzt.

Der pH-Wert der „europäischen“ Signalmischung betrug 7,13 und der „chinesischen“ Signalmischung 8,64.

Die frisch zubereitete Zahnpastenmischung (15 ml) wurde in jeden Container der Putzmaschine eingefüllt.

Material und Methode

Die Abrasion der Zahnpasten wurde nach der Standard Methode des Oral Health Research Institute, Indiana University School of Dentistry, gemessen und zitiert als relative Enamel Abrasion (REA) und relative Dentin Abrasion (RDA).

Die EU Signal und die CH Signal wiesen einen REA-Wert von 4,1 bzw. 2,1 und RDA-Werte von 90 bzw. 204 auf.

3.5 In-vitro-Pellikel

20 eingebettete Schmelz-Dentin-Proben wurden bei 37°C in separaten Gefäßen über Nacht im Brutschrank einer sterilisierten (γ -Bestrahlung) humanen Speichel-Lösung (2 ml) zur Ausbildung einer In-vitro-Pellikel ausgesetzt. Die Auswahl der 15 Probanden für die Speichelsammlung erfolgte zufällig im Rahmen der Mitarbeiter von Unilever. Die Teilnehmer wurden angewiesen zwischen den Mahlzeiten ihren Speichel in Sammelbehälter aufzufangen. Dieser wurde dann einer Sterilisation durch Gammabestrahlung unterworfen.

Die Proben wurden danach mit Puffer Lösung abgespült und in der Putzmaschine entweder mit EU Signal (n=10) oder CH Signal (n=10) für 25 Putzzyklen behandelt.

Die Proben wurden danach wieder mit Pufferlösung abgespült und in frischen sterilen Speichel für 2 Stunden zurückgesetzt bei 37°C.

Anschließend wurden die Proben mit Puffer Lösung gespült und mit weiteren 25 Putzzyklen gebürstet, wiederum abgespült und für 2 Stunden in sterilem Speichel gelagert und nachfolgend nochmals mit 25 Putzzyklen geputzt. Dieses Prozedere wurde über 10 Tage täglich wiederholt bis schließlich insgesamt 750 Putzzyklen pro Probe durchgeführt worden waren.

Die Kontrollgruppe und die Gruppe der In-vitro-Pellikel umfassten je 20 eingebettete Proben. Sie wurden über 10 Tage in der Putzmaschine entweder mit EU-Signal oder CH-Signal gereinigt, bis 750 Putzzyklen durchlaufen waren.

Präparate in der Gruppe der Polyphenolbehandlung:

Die In-vitro-Gruppe bestand aus insgesamt 40 Proben, verteilt auf 2 Gruppen mit je 20 Proben geputzt mit EU-Signal und CH-Signal.

In der Pellikel-Schwarztee-A-Gruppe (n= 20) wurden die Proben während des zweimal zweistündigen Speichelkontaktes pro Tag für 5 Minuten in aufgebrühtem schwarzem Tee gelagert.

Material und Methode

In der Pellikel-Schwarztee-B-Gruppe (n= 20) wurden die Proben während des zweimal zweistündigen Speichelkontaktes pro Tag für 15 Minuten in aufgebrühtem schwarzem Tee deponiert.

TEM Proben:

Nach Durchlaufen der 750 Putzzyklen wurden jeweils 2 Proben aus jeder Versuchsreihe in Vorbereitung für die TEM-Analyse über 2 Stunden in 2,5% Glutaraldehyd fixiert, für 3x5 Minuten mit Pufferlösung abgespült und in Pufferlösung gelagert bis zur weiteren Behandlung.

3.6 In-situ-Pellikel

36 Schmelz-Dentin-Proben wurden auf einer individuell angefertigten Schiene bukkal und palatinal in der Region des zweiten Prämolaren oder ersten Molaren im Oberkiefer rechts und links mittels Polysiloxan alternierend befestigt.

Die Proben wurden nachts über zehn Stunden von zwei Probanden intraoral getragen um eine initiale In-situ-Pellikelschicht auszubilden. Danach wurden die Proben mit Pufferlösung abgespült, von der Schiene demontiert und in der Zahnputzmaschine für 25 Putzzyklen mit EU-Signal (n=18) oder CH-Signal (n=18) gebürstet.

Danach wurden die Proben mit Pufferlösung abgespült und auf die Schiene zurückgesetzt und für weitere zwei Stunden intraoral getragen. Die Proben wurden daraufhin wiederholt mit Pufferlösung abgespült, mit 25 Putzzyklen gebürstet, mit Pufferlösung abgespült, auf die Schiene zurückgesetzt, für weitere zwei Stunden getragen und nachfolgend nochmals mit 25 Putzzyklen geputzt. Diese Prozedur wurde über zehn Tage fortgeführt, bis 750 Putzzyklen erreicht waren.

Zwei Proben aus jeder Versuchsreihe wurden für die weitere Analyse im TEM vorbereitet.

Das Ausmaß des Schmelz- und Dentinverschleißes an der Oberfläche wurde an den vorbereiteten Proben wie unten beschrieben gemessen.

Material und Methode

3.7 Messungen der Schmelz-Abrasion

Alle Knoop-Eindrücke wurden vor und nach Ablauf der 750 Putzzyklen mittels eines optischen Systems des Mikrohärte-Testers gemessen. Die Längen-(Δl) Unterschiede wurden für jede Probe erfasst und zur Berechnung des Tiefenunterschiedes herangezogen (*Abb. 7*).

Der Tiefenunterschied (Δd) wurde errechnet mit der Formel:

$$\begin{aligned}\Delta d &= 0,5 \Delta l / \tan 86,25 \\ &= 0,032772 \Delta l\end{aligned}$$

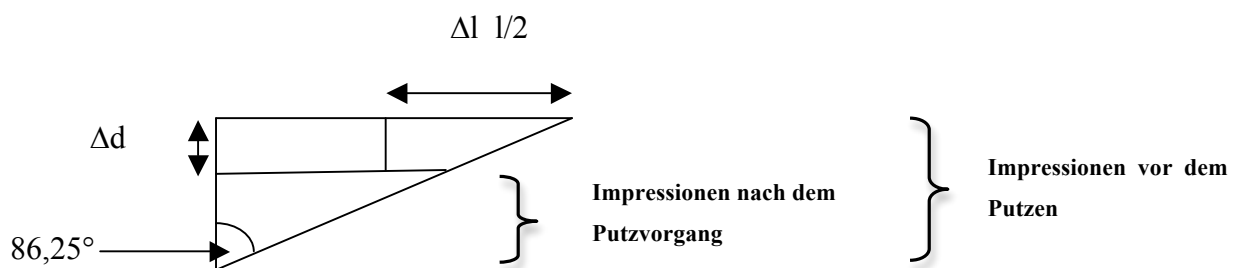


Abb. 7: Geometrie des Knoop-Eindrücke vor und nach Abrasion der Schmelzoberfläche (Joiner, Pickles, Tanner, Weader, & Doyle, 2004b)

Skizzenbeschreibung: senkrechter Pfeil = Δd

waagerechter Pfeil = $\Delta l 0,5$

Winkel von $86,25^\circ$ entspricht der Winkelhalbierenden des Prüfkörpers (Knoop)

Die Menge der Schmelzabrasion entsprach dem Tiefenunterschied (Δd), (*Abb. 7*).

3.8 Messungen der Dentin-Abrasion

Mit dem Interferenzmikroskop (NewView 100, Zygo Corp., Middlefield, CT, USA) wurde die Oberflächenstruktur vor und nach dem Ablauf der 750 Putzzyklen gemessen.

Das Mikroskop wurde kombiniert mit einem Weißlicht-Interferometer genutzt, um ein 3D-Bild der Oberfläche mit einer Auflösung von $0,5 \mu\text{m}$ in x- und y-Richtung und $0,1 \text{ nm}$ in der z-Achse darzustellen. Ausgehend vom 3D-Bild war es möglich den Stufenabsatz an der Schmelz-Dentin-Grenze zu ermitteln. Dazu wurden jeweils 2 repräsentative Bereiche der Schmelz- und Dentingrenzregion jeder Probe ausgewählt und der Höhenunterschied zwischen

Material und Methode

Schmelz und Dentin errechnet. Diese Daten wurden korrigiert um die ermittelten Abrasionswerte für den Schmelz, so dass das Ausmaß der Dentinabrasion ermittelt werden konnte.

3.8.1 Statistische Analyse

Die statistische Analyse erfolgte mittels ANOVA. Zum Vergleich einzelner Versuchsgruppen wurde der Students-t-Test herangezogen. Als Signifikanzniveau wurde $p \leq 0,01$ vorgegeben.

3.9 TEM-Analyse

Nach dem letzten Putzvorgang wurden die für die TEM-Analyse vorgesehenen Proben mit Pufferlösung abgespült und in Pufferlösung gelagert.

3.9.1 Fixierung der Pellikel

Die Proben wurden in 2,5 % Glutaraldehyd für 2 Stunden fixiert, danach dreimal mit Pufferlösung gespült, für 2 Stunden in 1% Osmiumsäure nachfixiert, wiederum dreimal mit Pufferlösung abgespült und bis zur weiteren Verwendung in Pufferlösung gelagert.

3.9.2 Entwässerung und Einbettung der Proben

Die Entwässerung erfolgte in der aufsteigenden Alkoholreihe. Die Präparate wurden nacheinander in Alkohol der Konzentrationen 50% (2x10 min), 70% (2x10 min), 90% (2x 10 min) und 100% (2x 20 min) gelagert. Es folgte eine Lagerung in Propylenoxid (2x 20 min).

Die erste Epoxidharzmischung enthielt Araldit (26 Teile), DDSA (24 Teile) und 3% Beschleuniger (1,5 Teile). In diese Epoxidharzmischung, versetzt mit Propylenoxid 1:1, wurden über Nacht die Proben bei 37°C im Brutschrank eingebracht.

Die zweite Epoxidharzmischung mit 2% Beschleuniger (1 Teil) wurde mit den umgesetzten Proben für eine weitere Nacht im Brutschrank bei 37°C aufbewahrt.

Die dritte Epoxidharzmischung mit 2 % Beschleuniger (1 Teil) wurde mit den umgesetzten Proben in einer Einbettform für ca. zwei Tage im 65°C heißen Ofen ausgehärtet.

Material und Methode

3.9.3 Herstellung von befilmten Kupfer-Grids

Ein Objektträger wurde für eine Minute in 1% Pioloformlösung getaucht. Nach dem Trocknen wurde das Pioloformnetz schwimmend in Aqua dest. abgelöst und mit Kupfer-Grids belegt.

Anschließend wurde das belegte Netz mit einem Objektträger aufgefangen und getrocknet.

3.9.4 Schneiden am Ultramikrotom

An den eingebetteten Proben wurde ein Ausschnitt der pellicelbedeckten Dentinoberfläche durch Trimmen der Überschüsse freigelegt. Das Schneiden der Ultradünnschnitte erfolgte mit einem Diamantmesser (Diatome 45°, Leica, Benzheim) in einem Ultramikrotom (Ultracut E, Reichert, Heidelberg).

Im Ultramikrotom wurden die Schnitte bei einer Dicke von 80-90 nm auf einem mit Pioloform (1%)-belegten Grid aufgefangen.

3.9.5 Kontrastierung

Die Ultradünnschnitte wurden mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert.

3.9.6 TEM-Analyse

Die Ultradünnschnitte wurden in einem Transmissionselektronenmikroskop TECNAI 12 Biotwin (FE, Eindhoven, NL) bei Vergrößerungen von 20.000- bis 120.000-fach analysiert. Die Ultrastruktur und Dicke der Pellicel auf der Dentinoberfläche wurden im TEM untersucht. Jeweils repräsentative und charakteristische Bereiche wurden fotografiert.

Ergebnisse

4 Ergebnisse

4.1 Abrasionswerte der Schmelz- und Dentinprüfkörper

4.1.1 Zahnpastenabrasion auf Zahnschmelz

Die Mittelwerte für die Zahnschmelzabrasion unter den verschiedenen Bedingungen der In-vitro- sowie In-situ-Pellikelbildung sind in den Tabellen 1-3 zusammengefasst sowie in den *Abbildungen 8 und 9* grafisch veranschaulicht. Bei Anwendung der Zahnpaste Signal Europa konnte sowohl in Folge der In-vitro- als auch der In-situ-Pellikelbildung eine signifikante ($p<0,01$) Reduktion der Schmelzabrasion festgestellt werden (*Abb. 8*). Im Gegensatz dazu hatte weder die in vitro noch die in situ gebildete Pellikel einen signifikanten Einfluss auf die Schmelzabrasion beim Putzen mit der Paste Signal China (*Abb. 8*). Allerdings zeigten sich signifikante ($p<0,01$) Unterschiede im Schmelzabrieb zwischen den Proben mit in vitro beziehungsweise in situ gebildeten Pellikel nach Anwendung der Zahnpaste Signal China (*Abb. 8*).

Die zweimal tägliche Exposition in Schwarztee hatte weder im Fall der Schmelzproben mit in vitro gebildeten Pellikel (*Abb. 2*), noch im Fall der Schmelzproben mit in situ gebildeter Pellikel (Tab. 3) einen signifikanten Einfluss auf den Schmelzabrieb. Auch durch eine längerzeitige Exposition in Schwarztee über zweimal täglich 15 min ließ sich der abrasionsprotektive Effekt der Pellikel unabhängig von der verwendeten Zahnpaste nicht steigern (Tab. 2, Tab. 3, *Abb. 9*).

Tabelle 1: Mittelwerte und Standardabweichungen für die Schmelzabrasion an den Prüfkörpern mit In-vitro- beziehungsweise In-situ-Pellikel im Vergleich zu Schmelzkontrollproben ohne Pellikel bei Anwendung der Zahnpaste Signal Europa (RDA=90) und Signal China (RDA=204).

Vorbehandlung	Zahnpaste	Schmelzabrasion (μm)
Puffer (=Kontrolle)	Signal Europa	$0,23 \pm 0,03$
Puffer (=Kontrolle)	Signal China	$0,06 \pm 0,03$
In-vitro-Pellikel	Signal Europa	$0,11 \pm 0,04$
In-vitro-Pellikel	Signal China	$0,05 \pm 0,02$
In-situ-Pellikel	Signal Europa	$0,03 \pm 0,01$
In-situ-Pellikel	Signal China	$0,08 \pm 0,02$

Ergebnisse

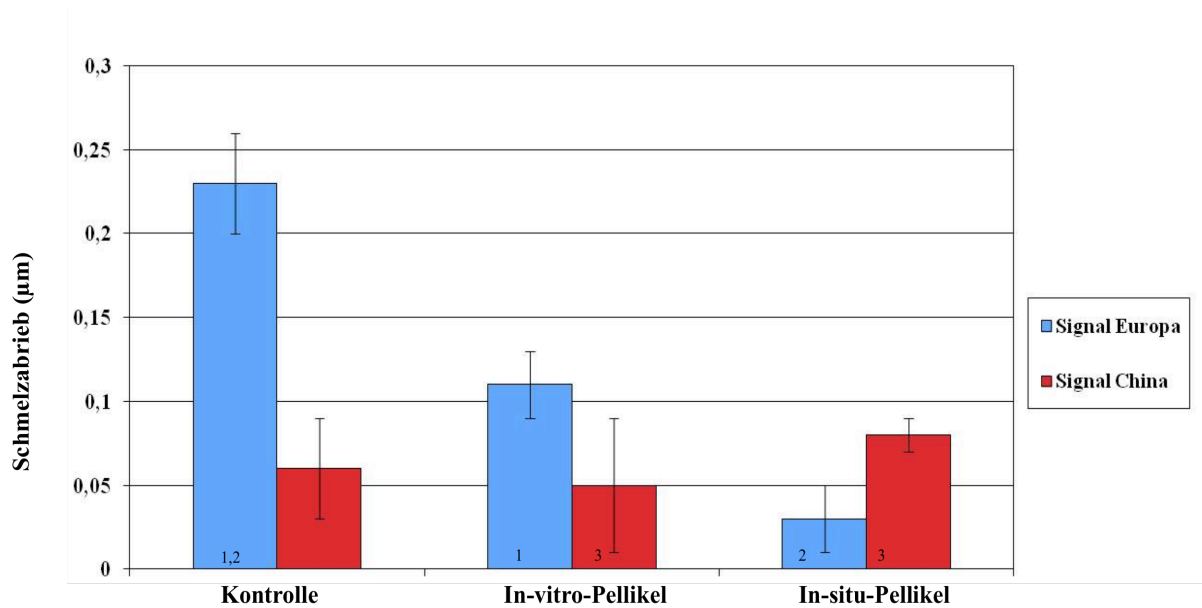


Abb. 8: Schmelzabrieb (Mittelwerte und Standardabweichungen) an den Kontrollproben ohne Pellikel sowie an den Prüfkörpern mit In-vitro- beziehungsweise In-situ-Pellikel nach Anwendung der Zahnpasten Signal Europa (RDA=90) und Signal China (RDA=204). Signifikante Unterschiede ($p < 0,01$) zwischen den Messwerten für die Schmelzabrasion sind durch identische Zahlen in den Säulen des Diagramms markiert.

Tabelle 2: Mittelwerte und Standardabweichungen für die Schmelzabrasion an den Prüfkörpern mit In-vitro-Pellikel und zusätzlicher Exposition in Schwarztee für 2x täglich 5 min (A) und 15 min (B) bei der Anwendung der Zahnpasten Signal Europa (RDA=90) und Signal China (RDA=204).

Vorbehandlung	Zahnpaste	Schmelzabrasion (µm)
In-vitro-Pellikel	Signal Europa	0,11 ± 0,04
In-vitro-Pellikel	Signal China	0,05 ± 0,02
In-vitro-Pellikel plus Schwarztee (A)	Signal Europa	0,083 ± 0,028
In-vitro-Pellikel plus Schwarztee (A)	Signal China	0,080 ± 0,034
In-vitro-Pellikel plus Schwarztee (B)	Signal Europa	0,066 ± 0,045
In-vitro-Pellikel plus Schwarztee (B)	Signal China	0,114 ± 0,131

Ergebnisse

Tabelle 3: Mittelwerte und Standardabweichungen für die Schmelzabration an den Prüfkörpern mit In-situ-Pellikel und zusätzlicher Exposition in Schwarztee für 2x täglich 5 min (A) und 15 min (B) bei der Anwendung der Zahnpasten Signal Europa (RDA=90) und Signal China (RDA=204).

Vorbehandlung	Zahnpaste	Schmelzabration (μm)
In-situ-Pellikel	Signal Europa	$0,03 \pm 0,01$
In-situ-Pellikel	Signal China	$0,08 \pm 0,02$
In-situ-Pellikel plus Schwarztee (A)	Signal Europa	$0,033 \pm 0,021$
In-situ-Pellikel plus Schwarztee (A)	Signal China	$0,028 \pm 0,012$
In-situ-Pellikel plus Schwarztee (B)	Signal Europa	$0,044 \pm 0,027$
In-situ-Pellikel plus Schwarztee (B)	Signal China	$0,030 \pm 0,030$

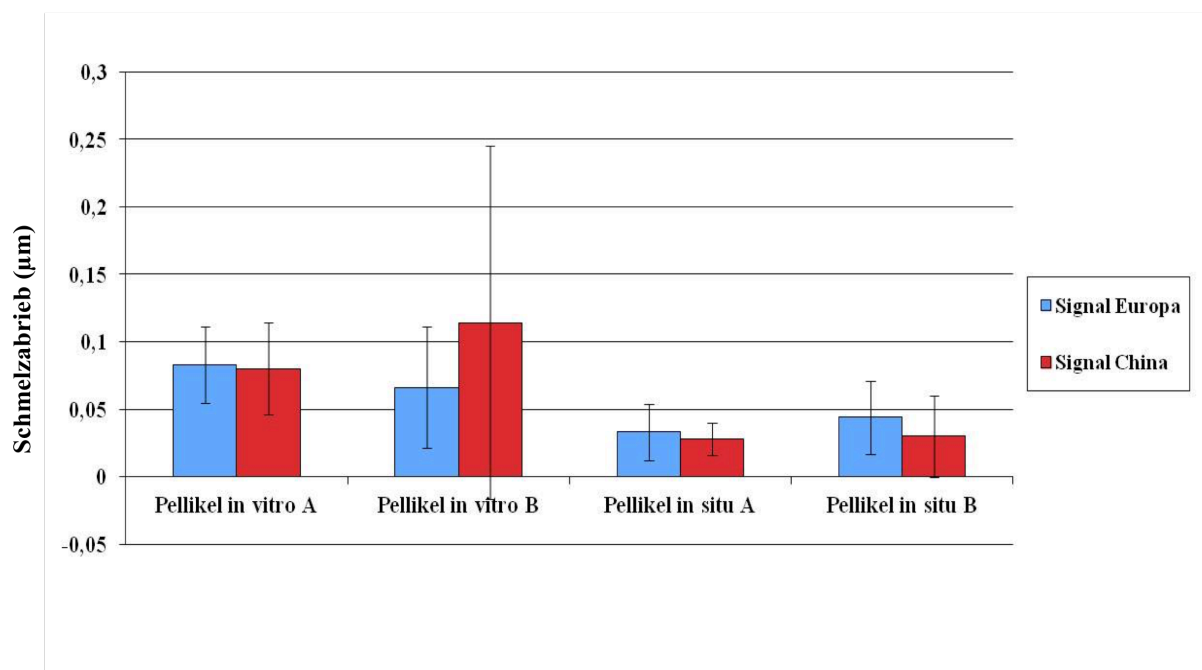


Abb. 9: Gegenüberstellung der Schmelzabration an den Prüfkörpern mit in vitro bzw. in situ gebildeter Pellikel und zusätzlicher Exposition in Schwarztee nach Anwendung der Zahnpasten Signal Europa (RDA=90) und Signal China (RDA=204). Die Exposition in Schwarztee erfolgte zweimal täglich über 5 min (A) oder 15 min (B).

Ergebnisse

4.1.2 Zahnpastenabrasion auf Dentin

In den Tabellen 4-6 finden sich die Mittelwerte der Dentinabrasion unter der In-vitro- und In-situ-Pellikelbildung. Die Abrasionswerte für das Dentin sind außerdem in den *Abbildungen 10* und *11* veranschaulicht. Im Vergleich zu den Dentinkontrollproben ohne Pellikel resultierte aus der Bildung der In-situ-Pellikel sowohl beim Putzen mit der Zahnpaste Signal Europa als auch beim Putzen mit der Zahnpaste Signal China eine signifikante Reduktion ($p < 0,01$) des Dentinabriebs (Tab. 4, *Abb. 10*). Im Gegensatz dazu war in Folge der In-vitro-Pellikelbildung nur bei Anwendung der Zahnpaste Signal China, aber nicht bei Anwendung der Paste Signal Europa, im Vergleich zu den Kontrollen eine signifikante Verringerung der Dentinabrasion festzustellen (Tab. 4, *Abb. 10*).

Die zusätzliche Exposition der Dentinproben in Schwarztee während der In-vitro- bzw. In-situ-Pellikelbildung hatte unabhängig von der Expositionszeit (5 min, 15 min) und unabhängig von der verwendeten Zahnpaste (Signal Europa, Signal China) keinen signifikanten Einfluss auf den Dentinabrieb beim Zähneputzen (Tab. 5, Tab. 6, *Abb. 11*).

Tabelle 4: Mittelwerte und Standardabweichungen für die Dentinabrasion an den Prüfkörpern mit In-vitro- bzw. In-situ-Pellikel im Vergleich zu Dentinkontrollproben ohne Pellikel bei Anwendung der Zahnpaste Signal Europa (RDA=90) und Signal China (RDA=204).

Vorbehandlung	Zahnpaste	Dentinabrasion (μm)
Puffer (=Kontrolle)	Signal Europa	$5,08 \pm 1,55$
Puffer (=Kontrolle)	Signal China	$6,03 \pm 1,23$
In-vitro-Pellikel	Signal Europa	$4,97 \pm 1,90$
In-vitro-Pellikel	Signal China	$3,38 \pm 1,15$
In-situ-Pellikel	Signal Europa	$1,94 \pm 0,73$
In-situ-Pellikel	Signal China	$1,70 \pm 0,45$

Ergebnisse

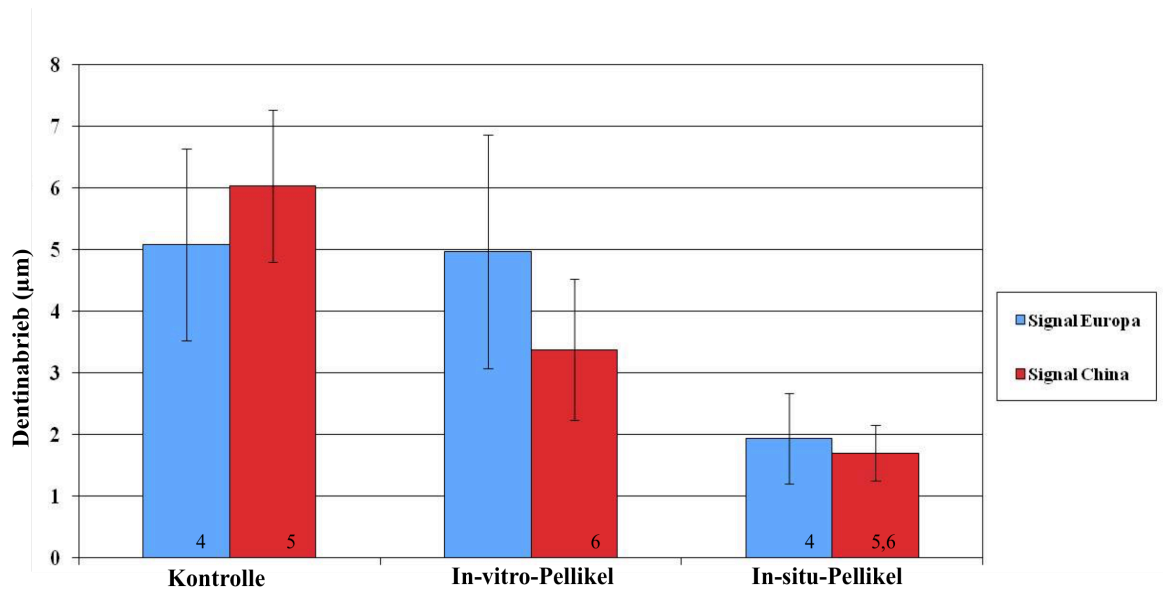


Abb. 10: Dentinabrieb (Mittelwerte und Standardabweichungen) an den Kontrollproben ohne Pellikel sowie an den Prüfkörpern mit In-vitro- beziehungsweise In-situ-Pellikel nach Anwendung der Zahnpasten Signal Europa (RDA=90) und Signal China (RDA=204). Signifikante Unterschiede ($p < 0,01$) zwischen den Messwerten für die Dentinabrasion sind durch identische Zahlen in den Säulen des Diagramms markiert.

Tabelle 5: Mittelwerte und Standardabweichungen für die Dentinabrasion an den Prüfkörpern mit In-vitro-Pellikel und zusätzlicher Exposition in Schwarztee für 2x täglich 5 min (A) und 15 min (B) bei der Anwendung der Zahnpasten Signal Europa (RDA=90) und Signal China (RDA=204).

Vorbehandlung	Zahnpaste	Dentinabrasion (µm)
In-vitro-Pellikel	Signal Europa	$4,97 \pm 1,90$
In-vitro-Pellikel	Signal China	$3,38 \pm 1,15$
In-vitro-Pellikel plus Schwarztee (A)	Signal Europa	$3,260 \pm 2,518$
In-vitro-Pellikel plus Schwarztee (A)	Signal China	$5,315 \pm 4,027$
In-vitro-Pellikel plus Schwarztee (B)	Signal Europa	$2,390 \pm 2,544$
In-vitro-Pellikel plus Schwarztee (B)	Signal China	$3,223 \pm 5,826$

Ergebnisse

Tabelle 6: Mittelwerte und Standardabweichungen für die Dentinabrasion an den Prüfkörpern mit In-situ-Pellikel und zusätzlicher Exposition in Schwarztee für 2x täglich 5 min (A) und 15 min (B) bei Anwendung der Zahnpasten Signal Europa (RDA=90) und Signal China (RDA=204).

Vorbehandlung	Zahnpaste	Dentinabrasion (μm)
In-situ-Pellikel	Signal Europa	$1,94 \pm 0,73$
In-situ-Pellikel	Signal China	$1,70 \pm 0,45$
In-situ-Pellikel plus Schwarztee (A)	Signal Europa	$0,581 \pm 0,922$
In-situ-Pellikel plus Schwarztee (A)	Signal China	$1,628 \pm 3,537$
In-situ-Pellikel plus Schwarztee (B)	Signal Europa	$0,494 \pm 0,528$
In-situ-Pellikel plus Schwarztee (B)	Signal China	$0,995 \pm 1,703$

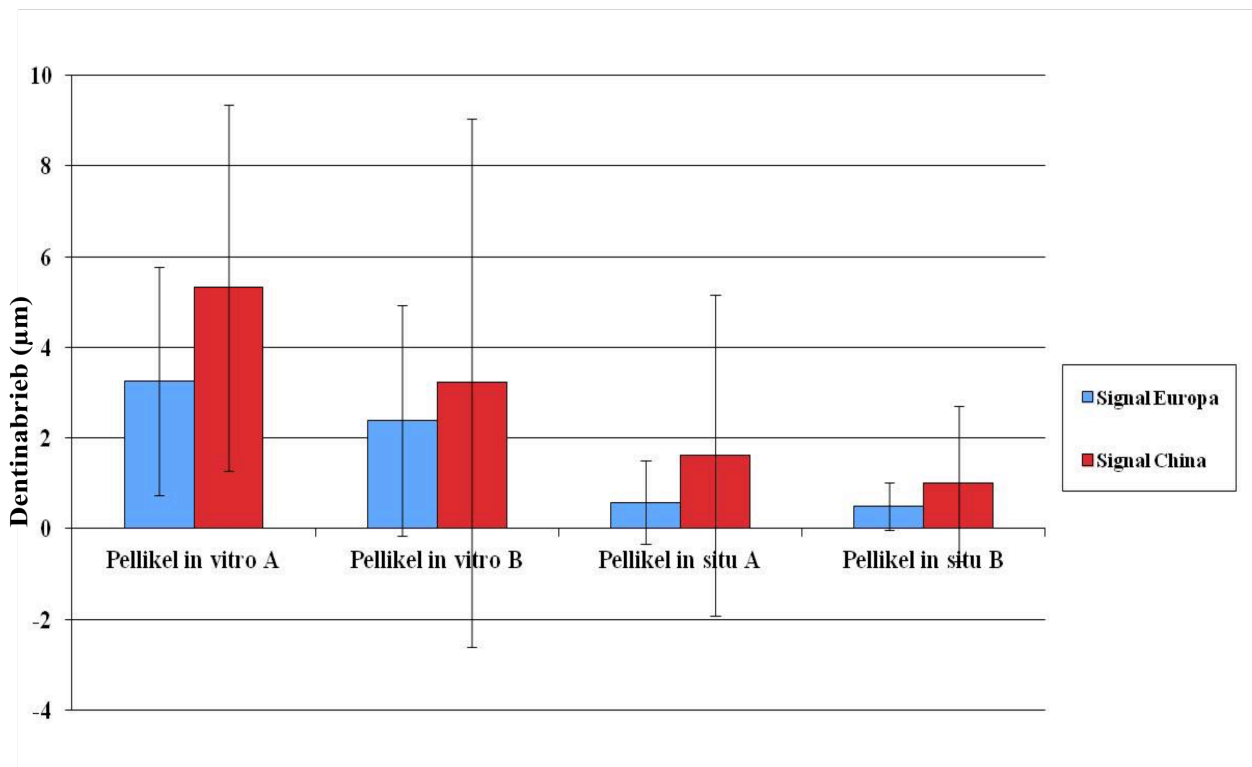


Abb. 11: Gegenüberstellung der Dentinabrasion an den Prüfkörpern mit in vitro bzw. in situ gebildeter Pellikel und zusätzlicher Exposition in Schwarztee nach Anwendung der Zahnpasten Signal Europa (RDA=90) und Signal China (RDA=204). Die Exposition in Schwarztee erfolgte zweimal täglich über 5 min (A) oder 15 min (B).

Ergebnisse

4.2 TEM-Analyse der Dentinproben

Die Möglichkeiten der transmissionselektronenmikroskopischen Pellikelanalyse beschränkten sich aufgrund der hohen Vergrößerung auf Ausschnitte der Proben. Die Analyse der Dentinschnitte im TEM diente der Abbildung ultrastruktureller Charakteristika und sollte einen Eindruck der differenten Pellikelformationen vermitteln.

4.2.1 TEM-Bilder der Kontrollproben (ohne Pellikel)

Die nicht im Speichel exponierten Prüfkörper zeigten erwartungsgemäß keine Existenz von Pellikelauflagerungen und imponierten bei der TEM-Analyse durch eine diskontinuierliche Dentinoberfläche (*Abb. 12-14*). Unabhängig von der Abrasivität der beiden verwendeten Zahnpasten waren an der Dentinoberfläche nach den 750 Putzzyklen freigelegte Kollagenfibrillen zu detektieren (*Abb. 12, 13*).

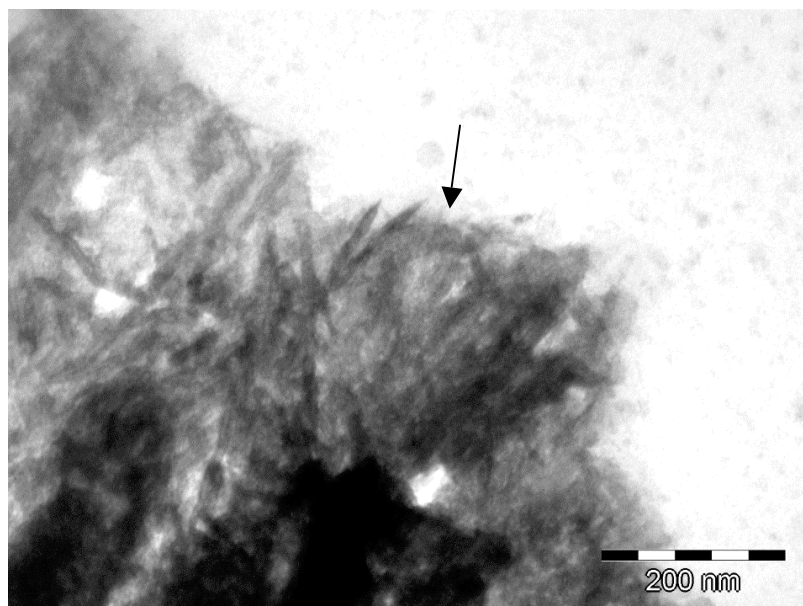


Abb. 12: TEM-Darstellung einer nicht speichel-exponierten Dentinprobe nach 750 Putzzyklen mit der Zahnpaste Signal China (RDA= 204). An der Dentinoberfläche sind freigelegte Kollagenfibrillen zu erkennen (Pfeil).

Originalvergrößerung : x 120.000

Ergebnisse

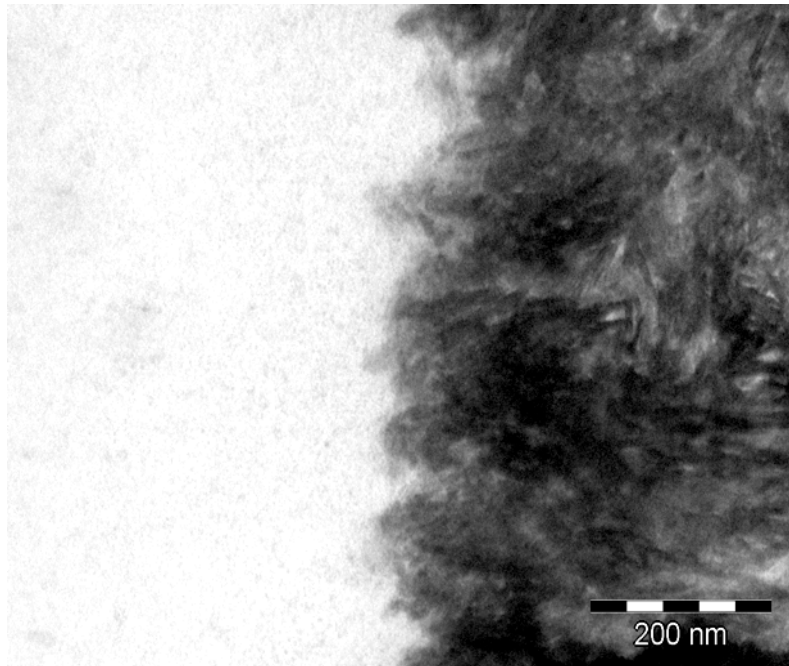


Abb. 13: Darstellung einer nicht speichelexponierten Dentinprobe nach 750 Putzzyklen mit der Zahnpaste Signal Europa (RDA= 90). Auf der diskontinuierlichen Dentinoberfläche lassen sich freigelegte Kollagenfibrillen detektieren.
Originalvergrößerung : x 120.000

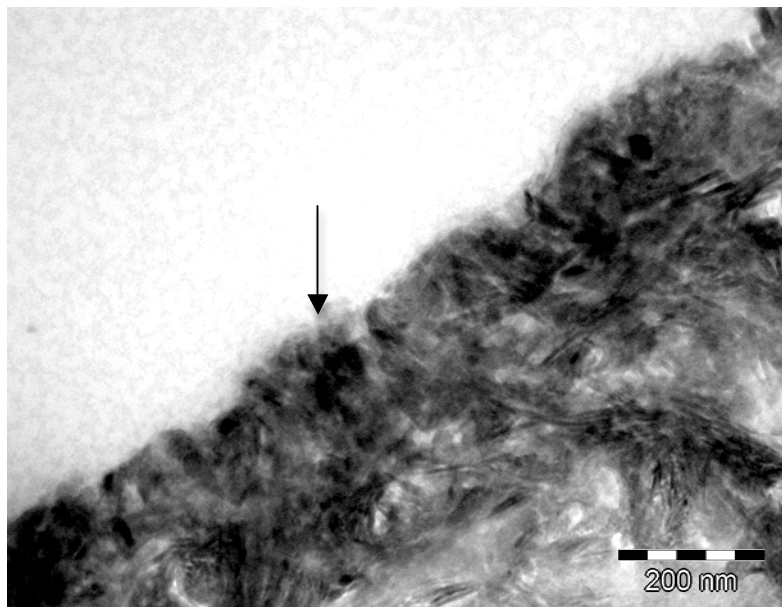


Abb. 14: Darstellung einer nicht speichelexponierten Dentinprobe nach 750 Putzzyklen mit der Zahnpaste Signal Europa (RDA= 90). An der Dentinoberfläche lassen sich freigelegte Kollagenfibrillen sowie schmierschichtartige Auflagerungen erkennen (Pfeil).
Originalvergrößerung: x 98.000

Ergebnisse

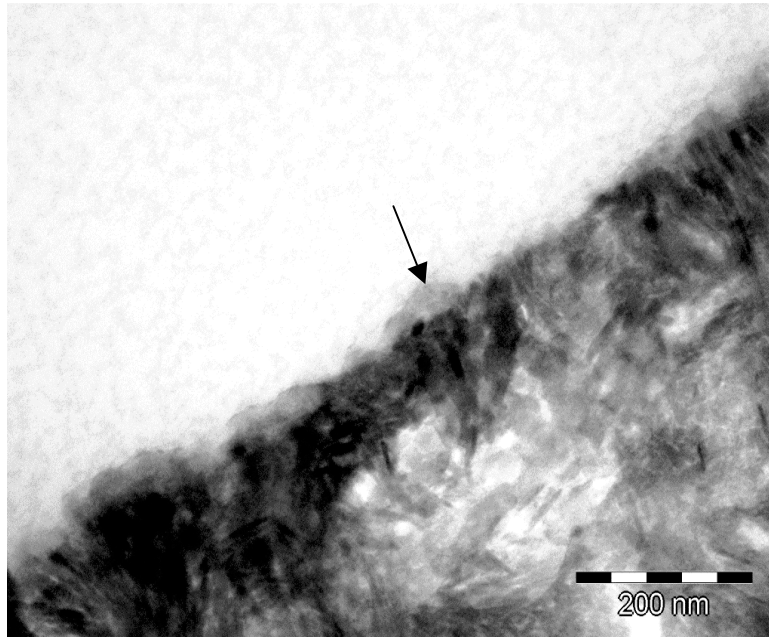


Abb. 15: Darstellung einer nicht speichlexponierten Dentinprobe nach 750 Putzzyklen innerhalb von 10 Tagen mit der Zahnpaste Signal Europa (RDA= 90). Die Dentinoberfläche ist von einer schmierschichtartigen Auflagerung bedeckt (Pfeil).
Originalvergrößerung: x 120.000

4.2.2 TEM-Bilder der In-vitro-Pellikel

Nach Abschluss der 750 Putzzyklen zeichneten sich die auf der Dentinoberfläche verbliebenen Residuen der In-vitro-Pellikel unabhängig von der verwendeten Zahnpaste sowohl im Hinblick auf die Ultrastruktur als auch die Schichtstärke der Restpellikel durch eine sehr große Heterogenität aus (*Abb. 16-19*). Zum einen war die Residualpellikel nur noch schemenhaft zu erkennen (*Abb. 16 und 19*), zum anderen wies die Restpellikel Schichtstärken von über 100 nm auf (*Abb. 17 und 18*).

Ergebnisse

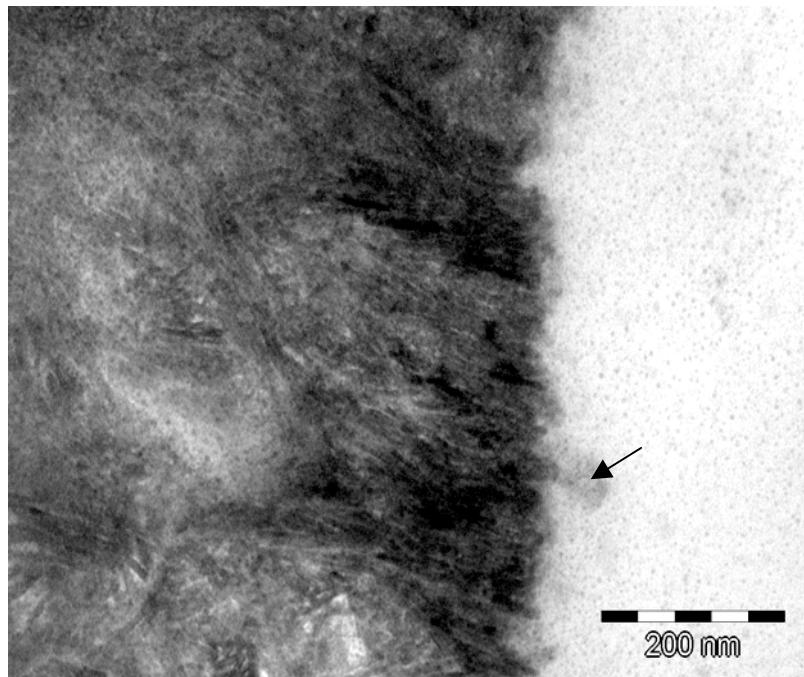


Abb. 16: TEM-Darstellung einer Dentinprobe, auf der durch Speichелеxposition eine In-vitro-Pellikel gebildet wurde, nach 750 Putzzyklen (innerhalb von 10 Tagen) mit der Zahnpaste Signal Europa (RDA=90). Auf der Dentinoberfläche lassen sich Residuen der Pellikelschicht (Pfeil) identifizieren.

Originalvergrößerung: x 120.000

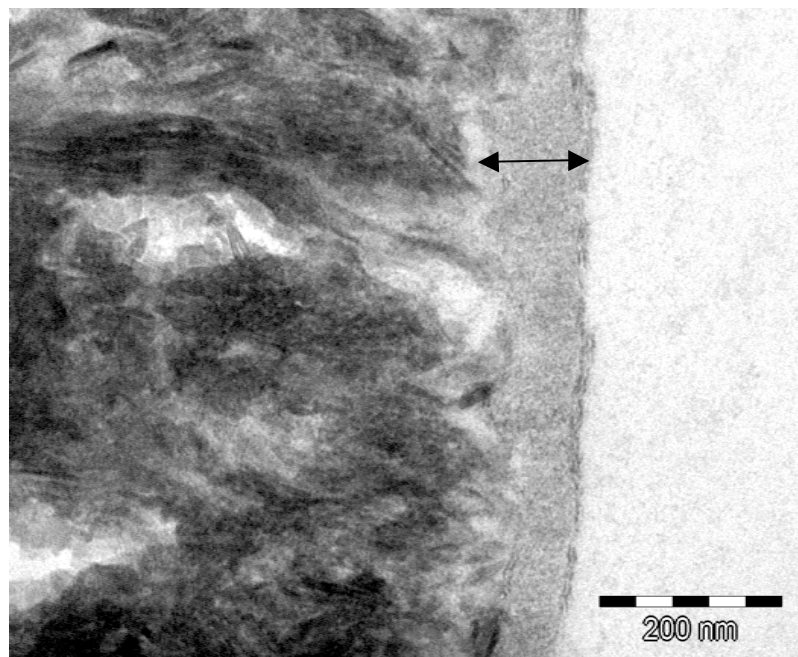


Abb. 17: TEM-Darstellung einer Dentinprobe, auf der durch Speichелеxposition eine In-vitro-Pellikel gebildet wurde, nach 750 Putzzyklen (innerhalb von 10 Tagen) mit der Zahnpaste Signal China (RDA=204). Die Dentinoberfläche ist von einer bis zu 100 nm messenden Pellikelschicht (Doppelpfeil) bedeckt.

Originalvergrößerung: x 120.000

Ergebnisse

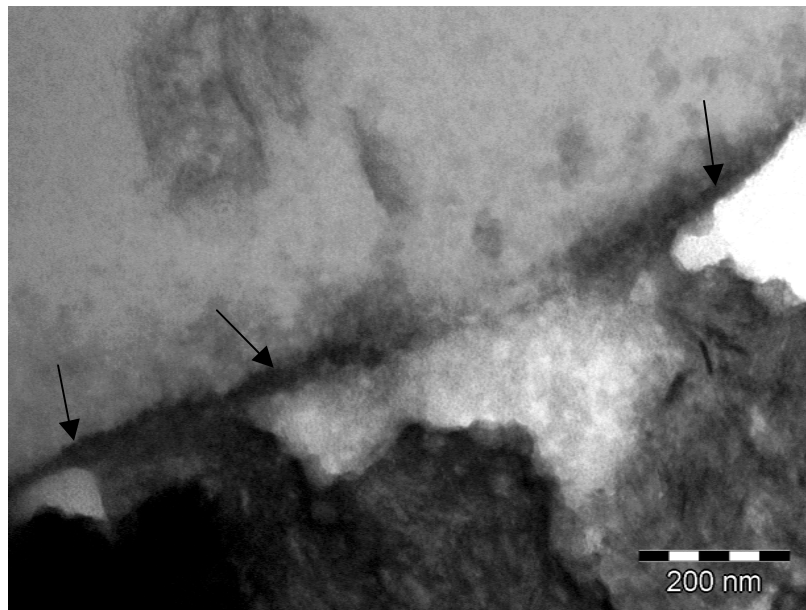


Abb. 18: TEM-Darstellung einer Dentinprobe, auf der durch Speichelsexposition eine In-vitro-Pellikel gebildet wurde, nach 750 Putzzyklen (innerhalb von 10 Tagen) mit der Zahnpaste Signal Europa (RDA=90). Die Pellikelresiduen auf der Dentinoberfläche bestehen aus einer elektronendichten Basisschicht (Pfeile) und lockerförmigen granulären Auflagerungen. Originalvergrößerung: x 98.000

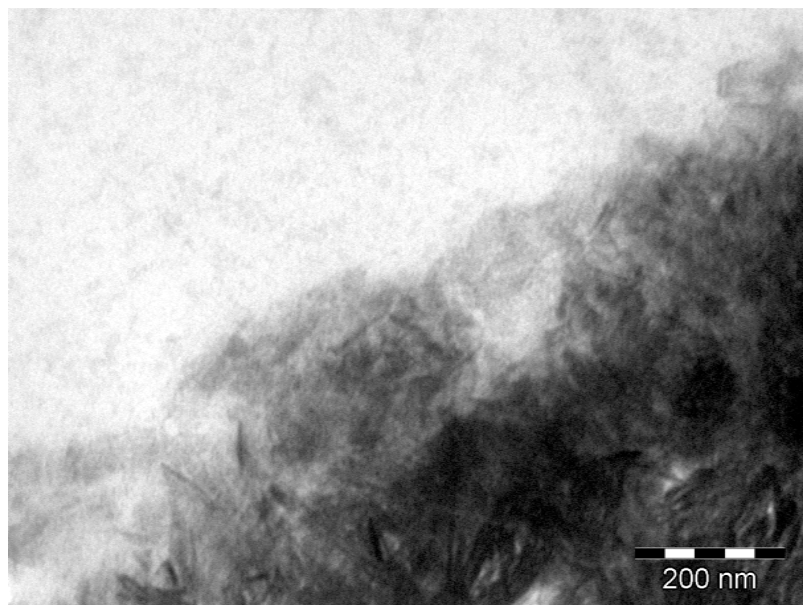


Abb. 19: TEM-Darstellung einer Dentinprobe, auf der durch Speichelsexposition eine In-vitro-Pellikel gebildet wurde, nach 750 Putzzyklen (innerhalb von 10 Tagen) mit der Zahnpaste Signal China (RDA=204). Diskontinuierliche Pellikelresiduen überziehen die Dentinoberfläche. Originalvergrößerung: x 98.000

Ergebnisse

4.2.3 TEM-Bilder der In-situ-Pellikel

Unabhängig von der Abrasivität der verwendeten Zahnpaste war nach Abschluss der 750 Putzzyklen auf den Dentinoberflächen nur noch eine sehr dünne 20-50 nm messende, diskontinuierliche granuläre Pellikelschicht zu detektieren (*Abb. 20-25*). Teilweise waren nur noch vereinzelt Pellikelresiduen auf der Dentinoberfläche zu identifizieren (*Abb. 23-25*).

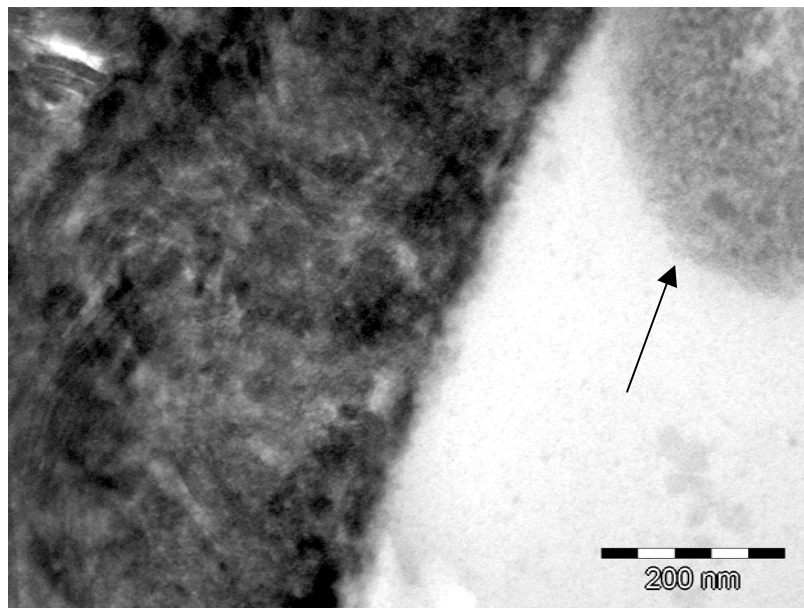


Abb. 20: TEM-Darstellung einer Dentinprobe, auf der durch Exposition in der Mundhöhle über einen Zeitraum von 10 Tagen eine In-situ-Pellikel gebildet wurde, nach 750 Putzzyklen mit der Zahnpaste Signal Europa (RDA=90). Auf der Dentinoberfläche lassen sich (schemenhaft) Pellikelresiduen mit einer globulären Auflagerung (Pfeil) erkennen. Originalvergrößerung: x 120.000

Ergebnisse

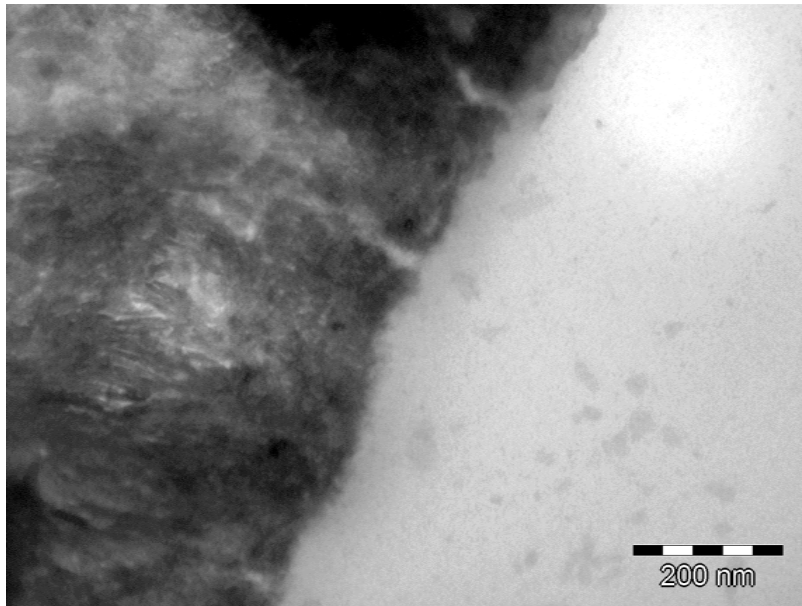


Abb. 21: TEM-Darstellung einer Dentinprobe, auf der durch Exposition in der Mundhöhle über einen Zeitraum von 10 Tagen eine In-situ-Pellikel gebildet wurde, nach 750 Putzzyklen mit der Zahnpaste Signal Europa (RDA=90). Auf der Dentinoberfläche sind vereinzelt locker formierte Pellikelreste sichtbar, die Pellikel ist weitestgehend entfernt.
Originalvergrößerung: x 98.000

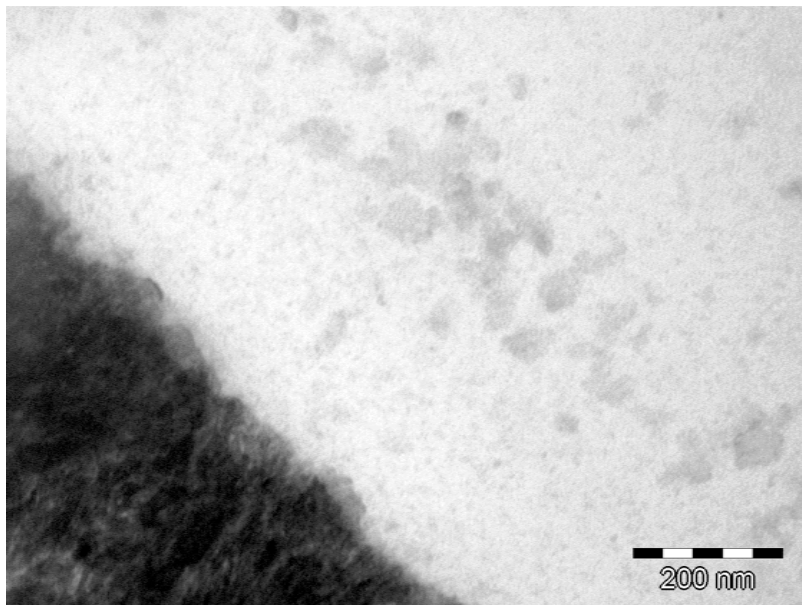


Abb. 22: TEM-Darstellung einer Dentinprobe, auf der durch Exposition in der Mundhöhle über einen Zeitraum von 10 Tagen eine In-situ-Pellikel gebildet wurde, nach 750 Putzzyklen mit der Zahnpaste Signal China (RDA=204). Die unregelmäßige residuale Pellikelschicht auf der Dentinoberfläche weist eine Schichtstärke von bis zu 50 nm auf.
Originalvergrößerung: x 98.000

Ergebnisse

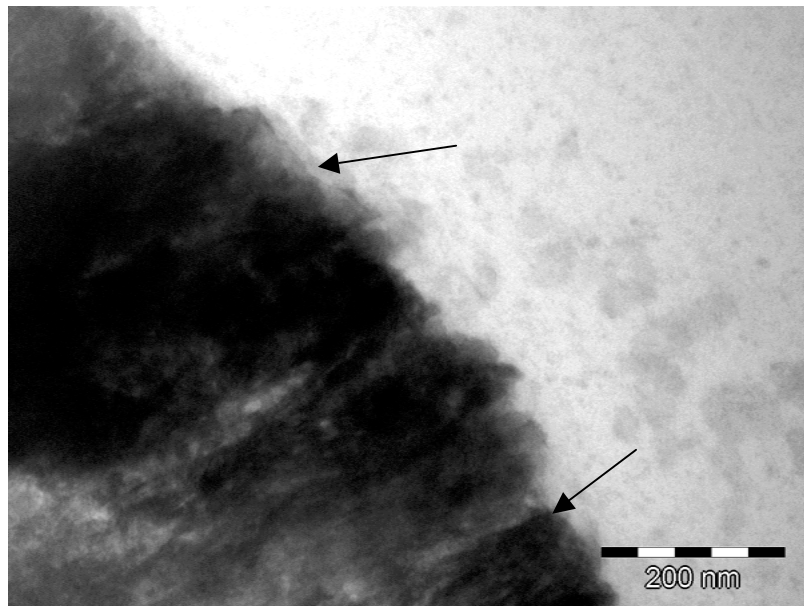


Abb. 23: TEM-Darstellung einer Dentinprobe, auf der durch Exposition in der Mundhöhle über einen Zeitraum von 10 Tagen eine In-situ-Pellicel gebildet wurde, nach 750 Putzzyklen mit der Zahnpaste Signal China (RDA=204). Zwischen den Pfeilen sind sehr locker granulär strukturierte Pellicelreste zu erkennen, die Pfeile zeigen auf die Dentinoberfläche.
Originalvergrößerung: x 120.000

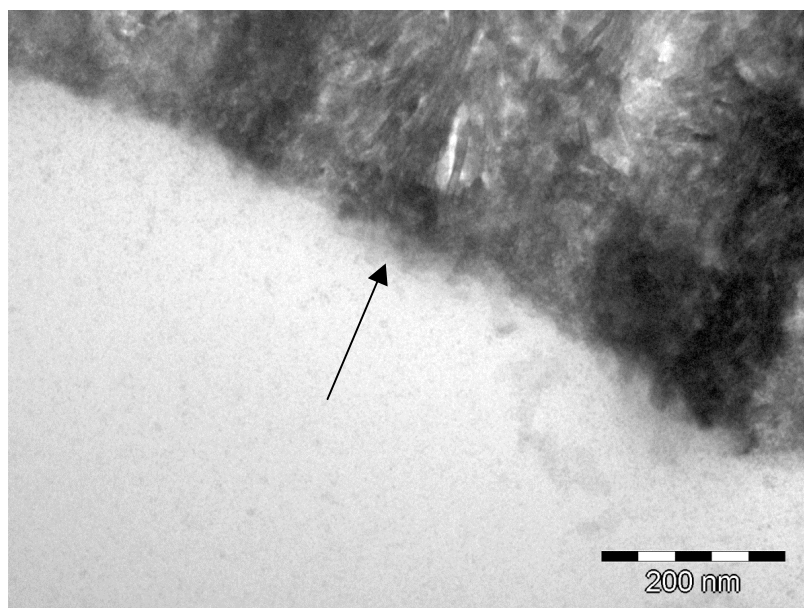


Abb. 24: TEM-Darstellung einer Dentinprobe, auf der durch Exposition in der Mundhöhle über einen Zeitraum von 10 Tagen eine In-situ-Pellicel gebildet wurde, nach 750 Putzzyklen mit der Zahnpaste Signal China (RDA=204). Auf der Dentinoberfläche sind nur noch partiell Pellicelreste (Pfeil) identifizierbar.
Originalvergrößerung: x 120.000

Ergebnisse

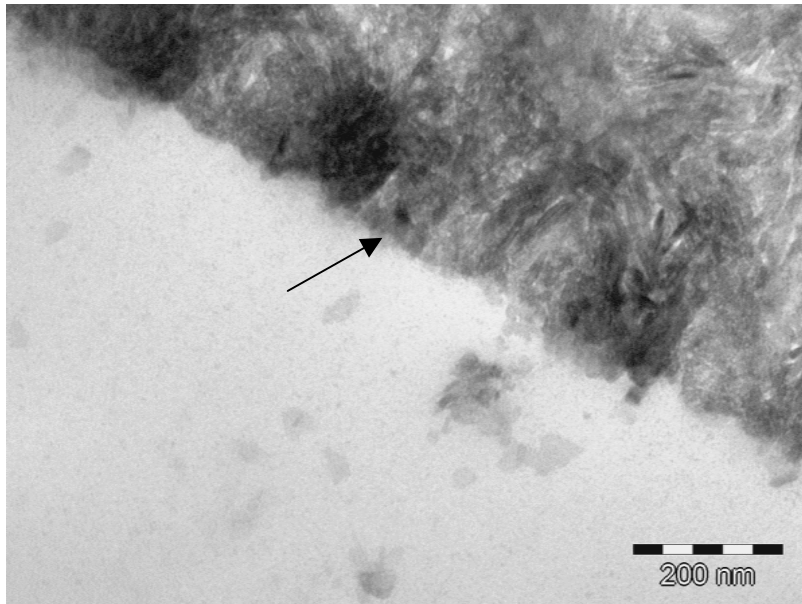


Abb. 25: TEM-Darstellung einer Dentinprobe, auf der durch Exposition in der Mundhöhle über einen Zeitraum von 10 Tagen eine In-situ-Pellikel gebildet wurde, nach 750 Putzzyklen mit der Zahnpaste Signal China (RDA=204). Die vereinzelt detektierbaren Pellikelreste (Pfeil) auf der Dentinoberfläche weisen eine Schichtstärke von bis zu 20 nm auf.
Originalvergrößerung: x 98.000

4.2.4 TEM-Bilder der In-vitro-Pellikel unter dem Einfluss von Schwarztee

Die nach dem Putzvorgang auf den Dentinproben verbliebenen In-vitro-Restpellikel zeichneten sich, unabhängig von der Zeitdauer der zweimal täglichen Exposition in Schwarztee, durch ein stark variierendes ultrastrukturelles Erscheinungsbild aus (*Abb. 26-31*). Nach dem 750 Putzzyklen umfassenden Zahnputzprozess waren- unabhängig von der Abrasivität der beiden verwendeten Zahnpasten- unter dem Einfluss der zweimal täglichen Schwarztee-Exposition mehrere 100 nm bis über 2 μ m messende homogene, elektronendichte Pellikelschichten detektierbar (*Abb. 26-29*), zum Teil waren nur noch diskontinuierliche Pellikelresiduen mit Schichtstärken von weniger als 50-100 nm identifizierbar (*Abb. 30 und 31*).

Ergebnisse

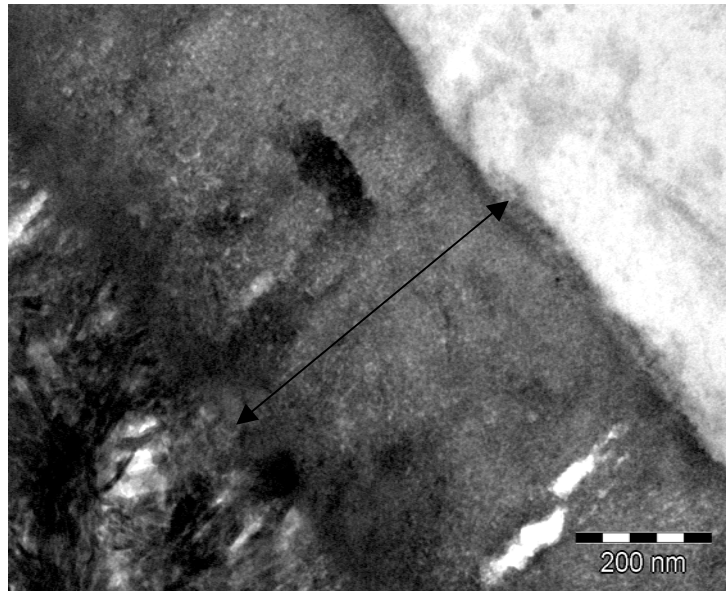


Abb. 26: TEM-Darstellung einer Dentinoberfläche mit einer über 10 Tagen gebildeten In-vitro-Pellikel und zweimal täglich fünfminütiger Exposition in Schwarztee nach 750 Putzzyklen mit der Zahnpaste Signal China (RDA=204). Auf der Dentinoberfläche ist eine bis zu 500 nm messende, elektronendichte, homogene Pellikelschicht (Doppelpfeil) zu erkennen. Originalvergrößerung: x 98.000

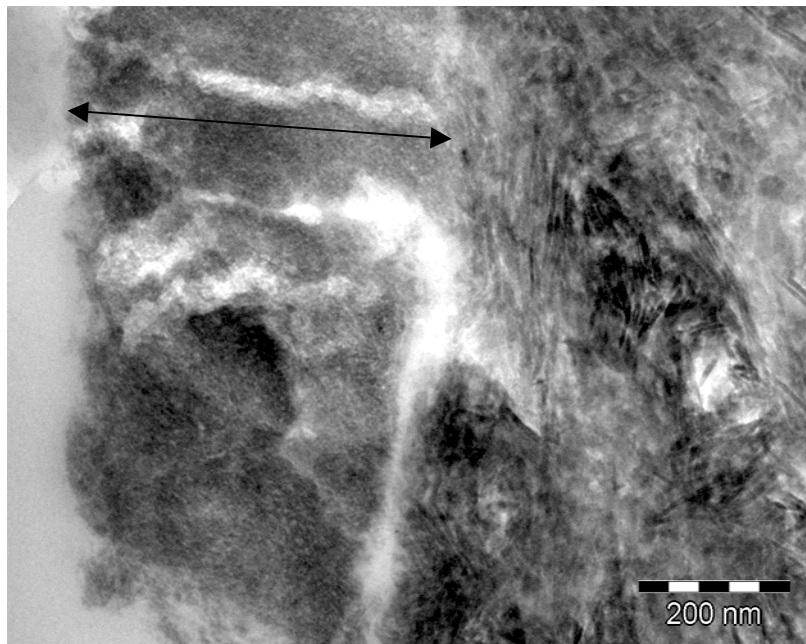


Abb. 27: TEM-Darstellung einer Dentinoberfläche mit einer über 10 Tagen gebildeten In-vitro-Pellikel und zweimal täglich 15-minütiger Exposition in Schwarztee nach 750 Putzzyklen mit der Zahnpaste Signal China (RDA=204). Auf der Dentinoberfläche lässt sich eine heterogen strukturierte Pellikelschicht mit Schichtstärken von über 400 nm detektieren (Doppelpfeil). Originalvergrößerung: x 98.000

Ergebnisse

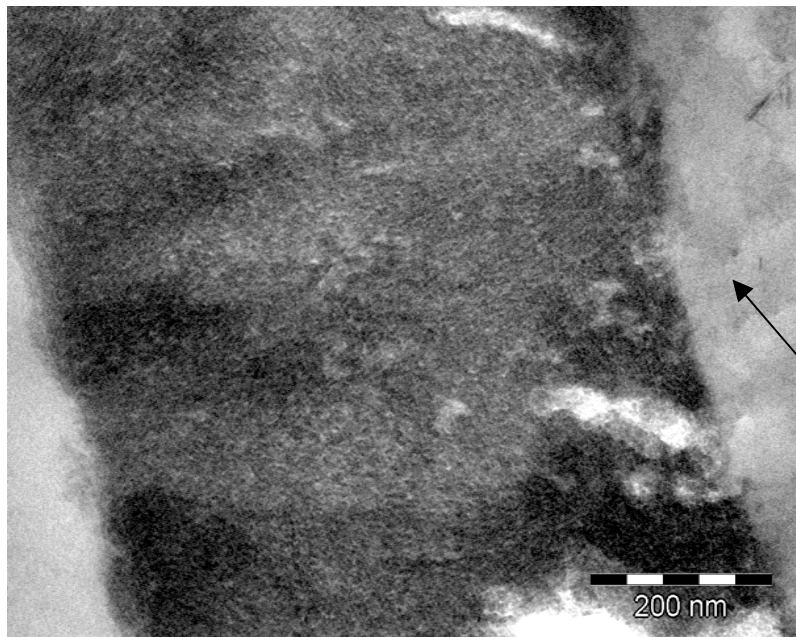


Abb. 28: TEM-Darstellung einer Dentinoberfläche mit einer über 10 Tagen gebildeten In-vitro-Pellikel und zweimal täglich 15-minütiger Exposition in Schwarztee nach 750 Putzzyklen mit der Zahnpaste Signal China (RDA=204). Die Dentinoberfläche (Pfeil) ist von einer über 600 nm dicken homogen elektronendichten Pellikelschicht überzogen, deren Schichtstärke bis zu 700 nm beträgt.

Originalvergrößerung: x 120.000

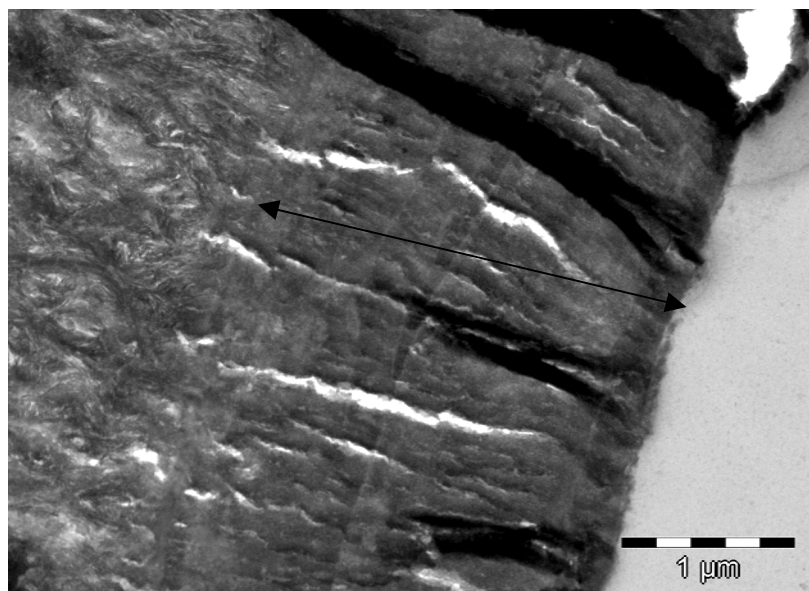


Abb. 29: TEM-Darstellung einer Dentinoberfläche mit einer über 10 Tagen gebildeten In-vitro-Pellikel und zweimal täglich fünfminütiger Exposition in Schwarztee nach 750 Putzzyklen mit der Zahnpaste Signal Europa (RDA=90). Auf der Dentinoberfläche ist eine bis zu 2,5 µm starke elektronendichte, homogene Pellikelschicht (Doppelpfeil) zu detektieren.

Originalvergrößerung: x 23.000

Ergebnisse

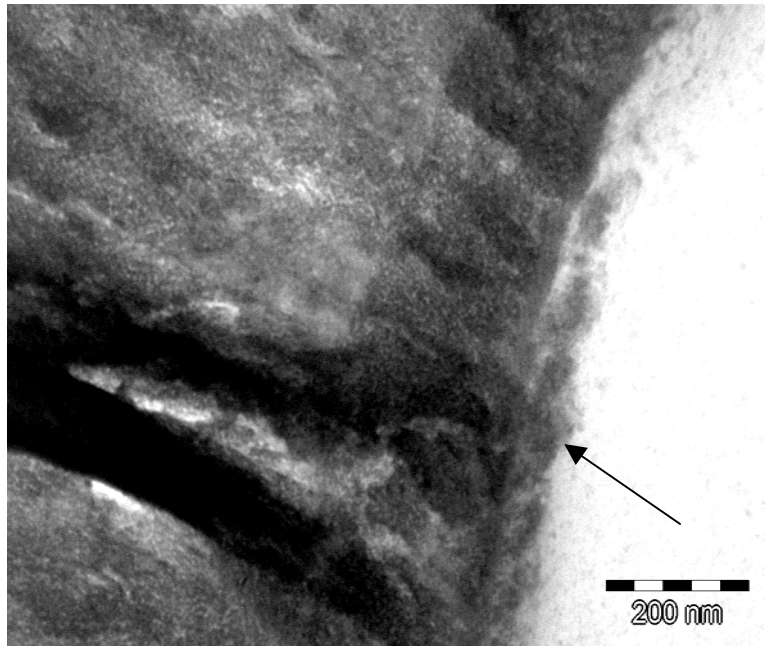


Abb. 30: TEM-Darstellung einer Dentinoberfläche mit einer über 10 Tagen gebildeten In-vitro-Pellikel und zweimal täglich fünfminütiger Exposition in Schwarztee nach 750 Putzzyklen mit der Zahnpaste Signal Europa (RDA=90). Auf der Dentinoberfläche sind globulär formierte Pellikelresiduen zu erkennen (Pfeil).
Originalvergrößerung: x 98.000

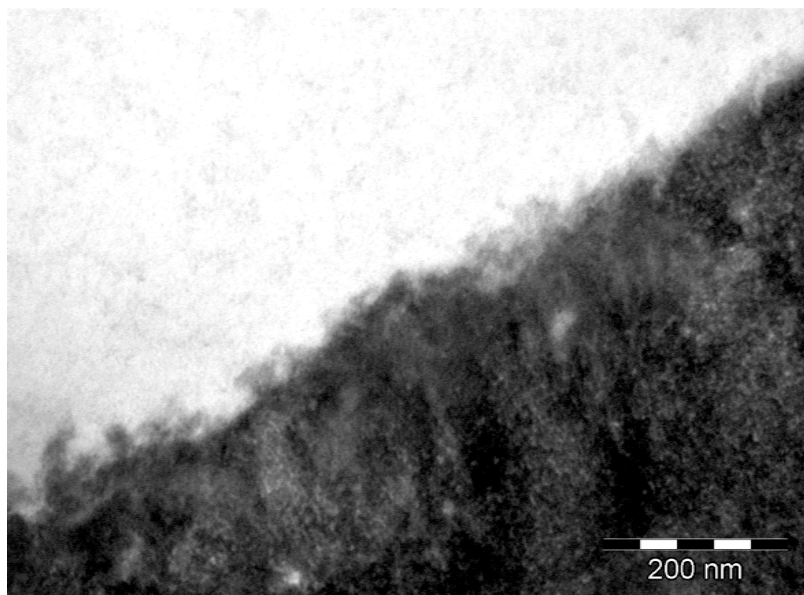


Abb. 31: TEM-Darstellung einer Dentinoberfläche mit einer über 10 Tagen gebildeten In-vitro-Pellikel und zweimal täglich fünfminütiger Exposition in Schwarztee nach 750 Putzzyklen mit der Zahnpaste Signal Europa (RDA=90). Auf der Dentinoberfläche lässt sich eine diskontinuierliche, locker formierte Pellikelrestschicht identifizieren.
Originalvergrößerung: x 120.000

Ergebnisse

4.2.5 TEM-Bilder der In-situ-Pellikel unter dem Einfluss von Schwarztee

Die zweimal täglich über einen Zeitraum von 10 Tagen erfolgte additive Exposition der Prüfkörper in Schwarztee hatte keinen gravierenden Einfluss auf das ultrastrukturelle Erscheinungsbild der In-situ-Pellikel nach dem Putzen der Proben über 750 Putzzyklen (*Abb. 32-38*) verglichen mit den Proben ohne Schwarztee-Exposition (*Abb. 20-25*). Unabhängig von der Abrasivität der Zahnpasten und der Zeitdauer der Exposition in Schwarztee waren auf den Dentinproben dünne Pellikelresiduen, zum Teil mit globulären Auflagerungen, zu detektieren (*Abb. 32-38*), die sich unter ultrastrukturellen Aspekten nicht grundlegend von den Pellikelresiduen nach dem Zähneputzen ohne Schwarztee-Exposition unterschieden (vergl. *Abb. 20-25*). Allerdings zeichnete sich die unter dem Einfluss von Schwarztee gebildete In-situ-Pellikel nach dem Putzprozess- verglichen mit der In-situ-Pellikel ohne tägliche Exposition in Schwarztee- durch eine kontinuierliche Bedeckung des Dentins sowie durch eine etwa doppelt so große Schichtstärke der Residualpellikel aus, die bis zu 100 nm betragen konnte.

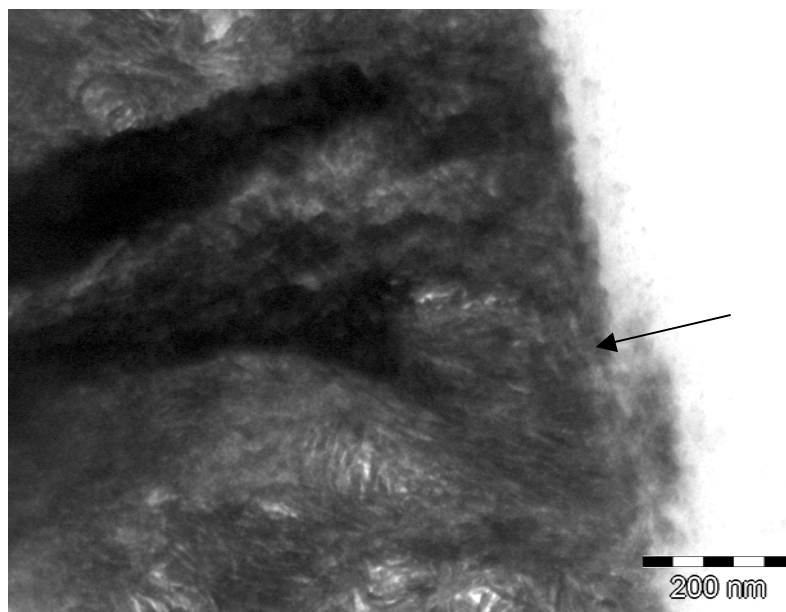


Abb. 32: TEM-Darstellung einer Dentinoberfläche mit einer über 10 Tagen gebildeten In-situ-Pellikel und zweimal täglicher, fünfminütiger Exposition in Schwarztee nach 750 Putzzyklen mit der Zahnpaste Signal Europa (RDA=90). Die Pellikelresiduen weisen eine Schichtdicke von 40-80 nm auf, direkt auf der Dentinoberfläche ist eine elektronendichte Pellikelbasisschicht zu erkennen (Pfeil).

Originalvergrößerung: x 98.000

Ergebnisse

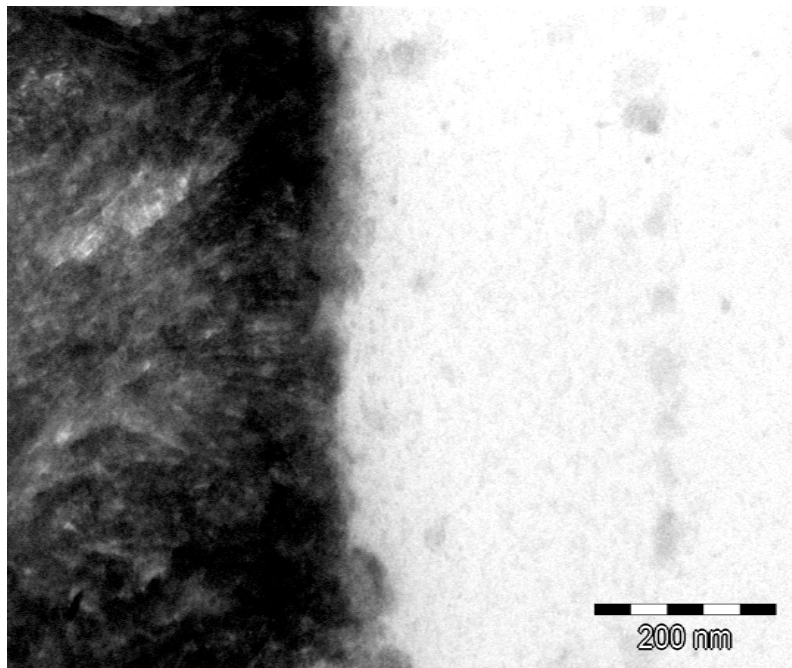


Abb. 33: TEM-Darstellung einer Dentinoberfläche mit einer über 10 Tagen gebildeten In-situ-Pellikel und zweimal täglicher, 15-minütiger Exposition in Schwarztee nach 750 Putzzyklen mit der Zahnpaste Signal Europa (RDA=90). Auf der Dentinoberfläche lassen sich globuläre Pellikelresiduen mit einer Schichtdicke zwischen 40 und 80 nm erkennen.
Originalvergrößerung: x 120.000

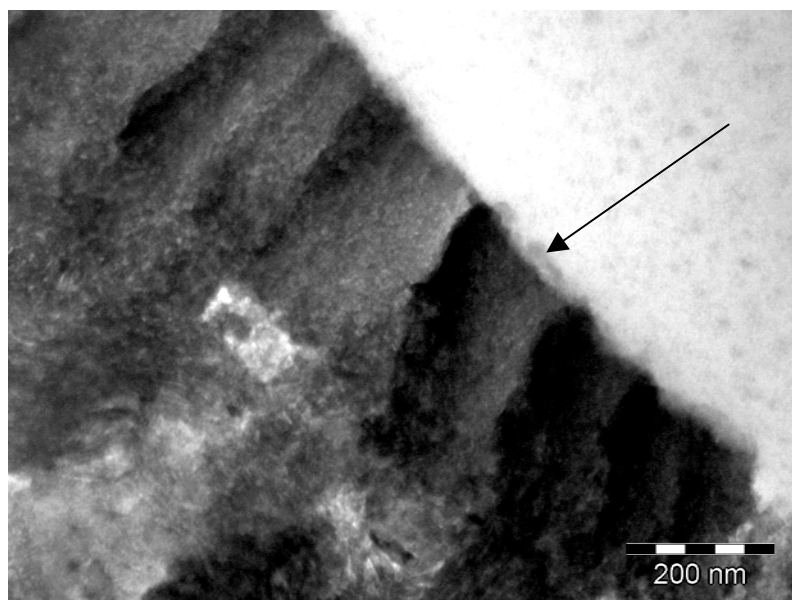


Abb. 34: TEM-Darstellung einer Dentinoberfläche mit einer über 10 Tagen gebildeten In-situ-Pellikel und zweimal täglicher, fünfminütiger Exposition in Schwarztee nach 750 Putzzyklen mit der Zahnpaste Signal China (RDA=204). Die Pellikelresiduen (Pfeil) auf der Dentinoberfläche weisen eine Schichtstärke von circa 40 nm auf.
Originalvergrößerung: x 98.000

Ergebnisse

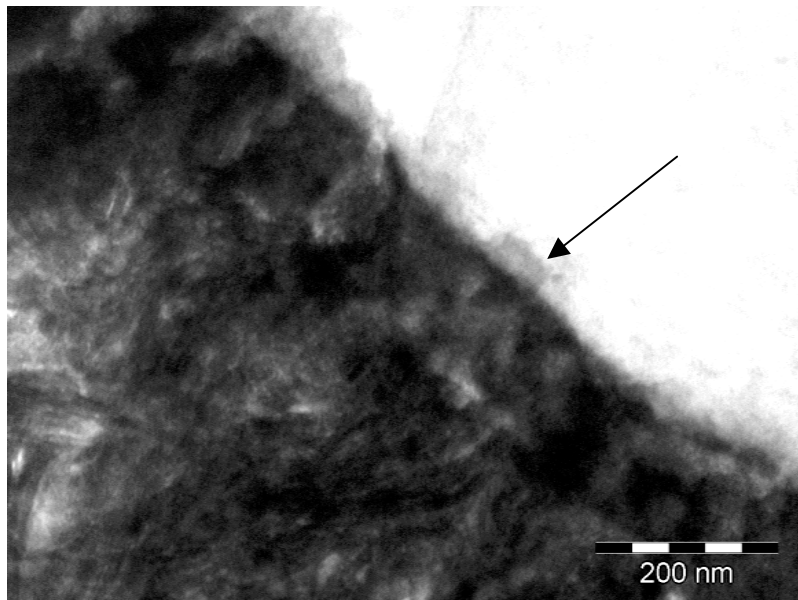


Abb. 35: TEM-Darstellung einer Dentinoberfläche mit einer über 10 Tagen gebildeten In-situ-Pellikel und zweimal täglicher, fünfminütiger Exposition in Schwarztee nach 750 Putzzyklen mit der Zahnpaste Signal China (RDA=204). Die Schichtstärke der diskontinuierlichen Pellikelresidualschicht (Pfeil) auf der Dentinoberfläche beträgt bis zu 100 nm. Originalvergrößerung: x 120.000

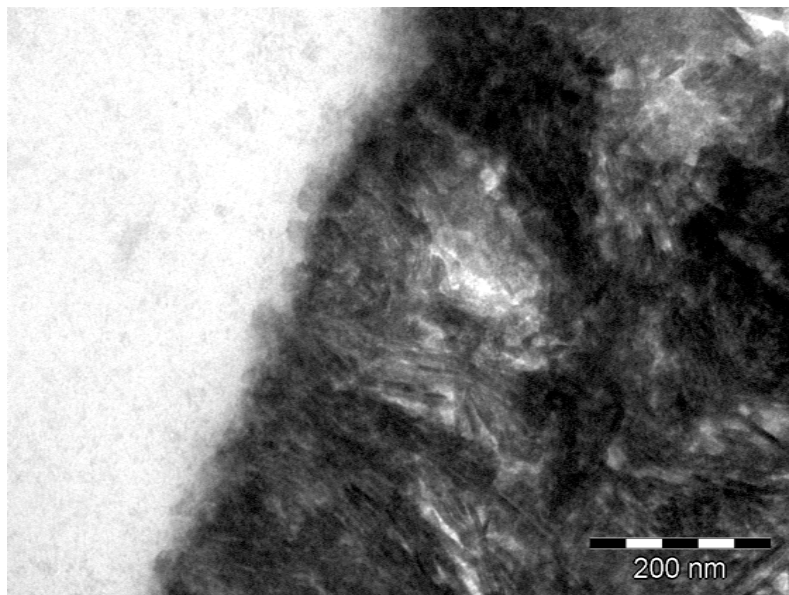


Abb. 36: TEM-Darstellung einer Dentinoberfläche mit einer über 10 Tagen gebildeten In-situ-Pellikel und zweimal täglicher, fünfminütiger Exposition in Schwarztee nach 750 Putzzyklen mit der Zahnpaste Signal Europa (RDA=90). Auf der Dentinoberfläche sind Pellikelresiduen mit einer Schichtstärke von bis zu 40 nm zu erkennen. Originalvergrößerung: x 120.000

Ergebnisse

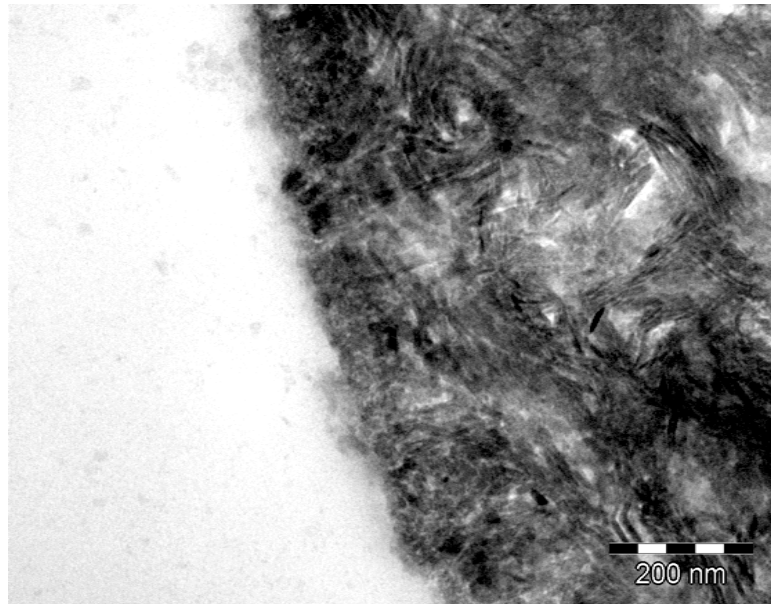


Abb. 37: TEM-Darstellung einer Dentinoberfläche mit einer über 10 Tagen gebildeten In-situ-Pellikel und zweimal täglich 15-minütiger Exposition in Schwarztee nach 750 Putzzyklen mit der Zahnpaste Signal China (RDA=204). Die Dentinoberfläche ist von einer locker formierten Pellikelrestschicht bedeckt.

Originalvergrößerung: x 98.000

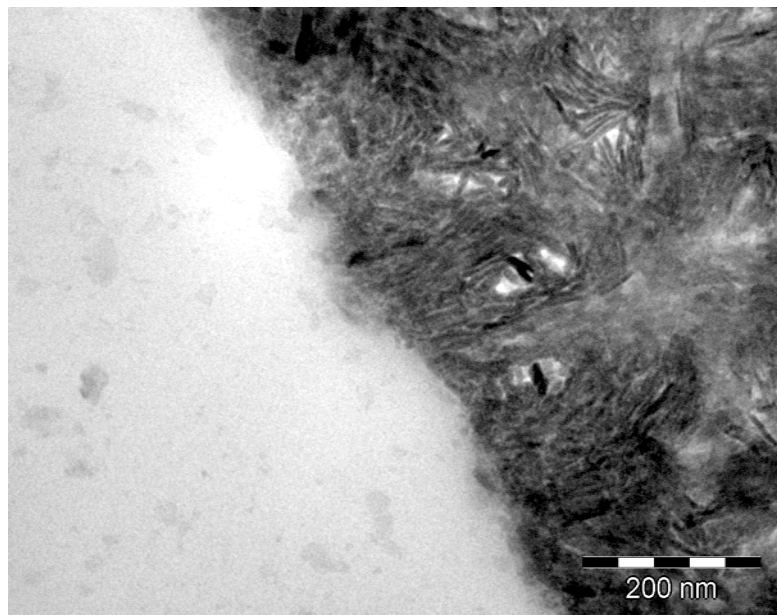


Abb. 38: TEM-Darstellung einer Dentinoberfläche mit einer über 10 Tagen gebildeten In-situ-Pellikel und zweimal täglich 15-minütiger Exposition in Schwarztee nach 750 Putzzyklen mit der Zahnpaste Signal China (RDA=204). Auf der Dentinoberfläche lassen sich Pellikelresiduen identifizieren.

Originalvergrößerung: x 120.000

5 Diskussion

5.1 Diskussion Material und Methodik

5.1.1 Studiendesign und Fragestellung

Eine Vielzahl von Untersuchungen bestätigen der Pellikel ihre protektiven Eigenschaften. Dazu gehören neben einer lubrikativen (I. C. Berg et al., 2003; Dawes, 2008) und säureprotektiven Wirkung (Attin et al., 2004) auch der Schutz vor abrasiven Agenzien. Im Zusammenhang mit Polyphenolen konnte bereits in ellipsometrischen Studien eine Modifikation der Pellikel dargestellt werden, die den Anlass gaben, die daraus resultierenden Effekte weitergehend zu untersuchen (Jenkinson & Lamont, 1997; Joiner et al., 2006; Joiner, Muller, Eloffson, & Arnebrant, 2004a).

Die Frage nach der klinischen Relevanz und Übertragbarkeit auf die In-vivo-Situation wurden jedoch nicht beantwortet, da bisher vorrangig In-vitro-Methoden zur Untersuchung der Pellikelschicht in Bezug auf ihre Abrasionsresistenz genutzt worden waren.

Das Ziel dieser Studie war es, eine In-vitro-Pellikel einer In-situ-Pellikel innerhalb einer Versuchsreihe gegenüber zu stellen und damit die Schmelz-Dentin-Abrasion zweier Zahnpasten unterschiedlicher Abrasivität zu untersuchen. Dabei wurde zugleich ein Teil der Pellikel mit Polyphenolen des schwarzen Tee's über zwei verschieden definierte Zeiträume kontaktiert. Desweiteren galt es zu klären, welchen Einfluss die Polyphenole des schwarzen Tee's auf die Pellikel hinsichtlich ihrer Abrasionsresistenz entwickeln können und welcher Nutzen daraus für die Prävention vor Zahnhartsubstanzverlust entsteht.

5.1.2 Art, Herstellung und Bearbeitung der Prüfkörper

Um möglichst naturidentische Voraussetzungen in der Versuchsreihe zu schaffen, wurde ausschließlich auf humane Schmelz-Dentin-Proben zurückgegriffen. Die Auswahlkriterien für die Schliffpräparate lagen in Karies- und Füllungsfreiheit der vorwiegend osteotomierten Weisheitszähne und extrahierten Prämolaren, die aus kieferorthopädischen Gründen entfernt werden mussten. Dies stellt in ihrer eingeschränkten Verfügbarkeit einen limitierenden Faktor dar, so dass aufgrund der einfacheren Beschaffung in vielen Studien auf Hydroxylapatit-Discs zurückgegriffen wird, die in ihrer Herstellung sicher eine hohe Homogenität der zu untersuchenden Oberfläche erlauben, oder bovine Präparate, die vorteilhafterweise gleichmäßige

Diskussion

mineralisierte und fluoridierte Zahnhartsubstanz aufweisen und in großen Untersuchungsreihen ihren Gebrauch finden. In den meisten der aktuellen Studien werden humane Präparate verwendet, um eine möglichst naturgetreue Oberfläche zu untersuchen (Addy et al., 2002; Attin et al., 2004; Hooper et al., 2003; Moore & Addy, 2005; Van der Weijden, Timmerman, Danser, & Van der Velden, 1998).

Die Politur wurde mittels Polierscheiben unter ständiger Wasserkühlung bis zu einer Körnung 4000 plus Diamant Suspension (0,25µm) zur Homogenisierung der Probenoberflächen durchgeführt. Dies scheint ausreichend zur Wiedergabe einer ähnlich der in situ befindlichen und durch Attrition und Abrasion „bearbeiteten“ natürlichen Vorlage zu sein (Barbour & Rees, 2006) und deckt sich mit anderen Untersuchungen (M. Hannig & Balz, 1999; Nekrashevych & Stösser, 2003; Nekrashevych, Hannig, & Stösser, 2004; Philpotts et al., 2005). Nicht auszuschließen sind verbliebene Mikrokratzer und Mikrorisse in der polierten Oberfläche, die als Initiator für den Zahnhartsubstanzverlust während der ersten Putzzyklen in Frage kommen. Jede Probe wurde unter einem Lichtmikroskop auf derartige Beschädigungen untersucht und qualitativ beurteilt.

5.1.3 Pellikelgewinnung

Die Pellikelbildung in situ ist ein komplexer Vorgang, der innerhalb von Sekunden unter bestimmten Voraussetzungen stattfindet (Armstrong, 1968; Leach & Saxton, 1966; Mayhall, 1970; Sønju & Rølla, 1973). Die selektive Adsorption der im Speichel befindlichen Proteine ist gebunden an eine adäquate Festkörperoberfläche.

Die Pellikelgewinnung für Versuchszwecke kann in situ und in vitro stattfinden. Für eine In-vitro-Pellikel kann Speichel von einem oder verschiedenen Probanden gesammelt werden. Dies hat bei mehreren Personen den Vorteil, dass ein Querschnitt aller Speichelinhaltsstoffe gewonnen wird und interindividuelle Unterschiede somit ausgeglichen werden. Damit der Speichel ohne Akkumulation von Mikroorganismen gelagert werden kann, ist es nötig den gesammelten Speichel vorzubehandeln. In einigen Studien wird daher der Speichel filtriert bzw. gereinigt. Dies kann nach Maupome *et al.* (Maupomé, Aguilar-Avila, Medrano-Ugalde, & Borges-Yáñez, 1999) zu schlechteren protektiven Eigenschaften auf humanen Schmelzproben führen. Aus diesem Grund wurde der verwendete Speichelpool unserer 15 Probanden einer Gamma-Sterilisation unterworfen, um dann bei einer Temperatur von 4°C gelagert zu werden. Die Gamma-Sterilisation findet insbesondere bei temperatursensiblen

Diskussion

Produkten ihren Einsatz und wird deswegen für Medizinprodukte wie zum Beispiel Implantate, Katheter, Kanülen, Instrumente, Handschuhe und Verbandsmaterial verwendet. Dabei wird zuverlässig die DNA von Mikroorganismen zerstört und die Keimbelastung inaktiviert.

Kautsky und Featherstone verglichen die Wirkung von Speichel *in vitro* und *in situ* auf Hydroxylapatitscheiben und stellten fest, dass die protektiven Eigenschaften der Pellikel stark voneinander abwichen (Kautsky & Featherstone, 1993). Vorteilhaft erweisen sich *In-vitro*-Methoden, um einzelne Komponenten wie Temperatur und pH-Wert leichter zu überwachen und, wenn mit einer hohen Anzahl von Proben innerhalb kurzer Zeit gearbeitet werden soll.

Um die Pellikelbildung unter *In-vitro*- und *In-situ*-Bedingungen möglichst einheitlich zu gestalten, war es während der Tragezeit der Schiene dem Probanden nicht gestattet, Nahrung oder Getränke außer Wasser zu konsumieren. Carpenter *et al.* (Carpenter et al., 2005) hat im Zusammenhang mit der Frage, welchen Einfluss Tee auf eine Chlorhexidin-Spülung ausübt, festgestellt, dass Tee und Chlorhexidin in Kombination verabreicht eine höhere Bindungsaffinität zu Hydroxylapatit aufzeigen. Und Joiner *et al.* (Joiner et al., 2006) bestätigt durch seine ellipsometrischen Studien die bessere Anbindung von CHX mit schwarzem Tee und macht dafür die elektrostatischen Anziehungskräfte zwischen dem adsorbierten kationischen Chlorhexidin und den negativ geladenen Tee-Komponenten verantwortlich. Die prolinreichen Proteine im Speichel stehen im Verdacht, die Polyphenole des Rotweines und des schwarzen Tees stärker an Hydroxylapatit zu binden (Joiner et al., 2003; Proctor et al., 2005). In einer *In-situ*-Studie von Hooper *et al.* (Hooper et al., 2003) wurde der Einfluss von erosiven Getränken (Orangensaft) auf die Abrasion auf Schmelz und Dentin untersucht. Das Ergebnis war eine höhere Anfälligkeit auf den Zahnpastenabrieb, insbesondere des Dentins, was die Vermutung bestätigt, dass das protektive Potenzial der Pellikel auf Schmelz und Dentin durch Säure beeinträchtigt wird. Ähnlich bestätigen andere Autoren den Zusammenhang zwischen Abrasion und Erosion. Speichel und Pellikel können zwar durch Remineralisierung den Verschleiß beeinflussen, aber nicht verhindern (C. Hannig et al., 2007; Jaeggi & Lussi, 1999; Shellis & Addy, 2014). Auch der Konsum von Milchprodukten (Vacca Smith & Bowen, 2000b), Sorbitol oder Xylitol hat einen Einfluss auf die Pellikelformation und -reifung. Dabei wird die Inkorporation von Milchproteinen und Casein in die Pellikel im Austausch mit Albumin herbeigeführt (Schüpbach et al., 1996).

Diskussion

Zur Ausbildung einer „initialen“ Pellikelschicht wurden die Proben zunächst zehn Stunden über Nacht in situ getragen. Die protektiven Eigenschaften einer Pellikel hängen neben der Zusammensetzung des Speichels auch von den Bildungszeiten der Pellikel ab. In wissenschaftlicher Auseinandersetzung darüber erfolgten viele Untersuchungen. Es wird angenommen, dass mit zunehmender Pellikelbildungszeit, Pellikeldicke und Reifung das schützende Potential gegenüber Diffusionsprozessen und Demineralisationen an der Schmelzoberfläche ansteigt. Nieuw Amerongen *et al.* (1987) fanden in ihren In-vitro-Untersuchungen heraus, dass eine 9 Minuten Kurzzeitpellikel bereits signifikant die Schmelzdemineralisation inhibieren kann (Nieuw Amerongen, Oderkerk, & Driessen, 1987). Nach 60 Minuten Bildungszeit kann ein Maximum des Schutzes erreicht werden. Maupomé *et al.* (Maupomé *et al.*, 1999) stellten in ihren Experimenten fest, dass sich eine 20 Minuten Pellikelschicht nicht signifikant von einer über sechs Stunden oder 24 Stunden in vitro gebildeten Pellikel unterscheidet. Dagegen benötigt laut Zahradnik *et al.* (Zahradnik *et al.*, 1976) eine Schmelzoberfläche in vitro unter dem Einfluss von gereinigtem Speichel sieben Tage Pellikelreifung bis zur Ausbildung eines adäquaten Schutzes. Kautsky und Featherstone stellten fest, dass eine über 18 Stunden gebildete In-vivo-Pellikelschicht einer gleichlang mit Hilfe von gereinigtem Speichel gebildeten In-vitro-Schicht im Schutz gegen Säureattacken überlegen ist (Kautsky & Featherstone, 1993). Hannig und Balz (1999) konnten keine signifikanten Unterschiede in situ zwischen einer 24 h- und 7 d-Pellikel in Bezug auf die Reduktion vor Zitronensäureattacken an der Schmelzoberfläche nachweisen (M. Hannig & Balz, 1999).

Zur Simulation der klinischen Situation wurden die Proben nach Bildung der 10-stündigen „über Nacht“ Pellikel morgens gereinigt und dann für weitere 2 Stunden in Speichelkontakt gehalten, bevor der zweite Putzzyklus startete. Der gleiche Vorgang wurde dann eine drittes Mal an diesem Tage durchgeführt, sodass jede Probe eine effektive Pellikelbildungszeit von 14 Stunden täglich und drei Reinigungszyklen durchlief. Dieser Ablauf entspricht einem realen täglichen Mundhygienerythmus und bietet im Gegensatz zu den Studien, in denen die Prüfkörper gänzlich ohne Pellikel oder mit zu kurzen Pellikelbildungszeiten behandelt werden, eine Annäherung an eine klinische Realität.

Die Proben für die in vivo gebildete Pellikelschicht wurden auf einer individuell angefertigten Trägerschiene befestigt und intraoral inseriert (Addy *et al.*, 2002; M. Hannig & Balz, 1999; Hooper *et al.*, 2003). Diese Methode hat sich aufgrund ihrer einfachen und schnellen Herstellungs- bzw. reversiblen Trageweise im Gegensatz zur fixen intraoralen Befestigung als vorteilhaft herausgestellt. Die Befestigung erfolgte auf der Schiene mittels Polysiloxanmasse,

Diskussion

da sich die Proben leicht, ohne die pellikelbelegte Oberfläche zu berühren, entfernen ließen. Bei der Platzierung der Schmelz-Dentin-Proben wurde auf einen regelmäßigen Wechsel zwischen Bukkal- und Palatinalfläche und zwischen Molaren- und Prämolarenregion geachtet. Hintergrund dieser Maßnahme sind Daten aus Untersuchungen, die zeigen, dass ortsbedingt unterschiedliche Pellikelschichtdicken entstehen können (M. Hannig, 1999). Verantwortlich dafür gemacht werden können variable Scherkräfte der Zunge und der Wange sowie der unterschiedlichen Proteinzusammensetzung des Speichels aus den verschiedenen Speicheldrüsen.

5.1.4 Probandenauswahl

Zwei Probanden wurden für die In-vivo-Versuche herangezogen. Voraussetzung zur Teilnahme an der Versuchsreihe war ein kariesfreies bzw. suffizient versorgtes Gebiss und der Ausschluss parodontaler Vorerkrankungen. In Untersuchungen zur Einschätzung, welchen Einfluss die Speichelfunktion auf den Verlust von Zahnhartsubstanz haben kann, kamen Young *et al.* zu dem Ergebnis, dass trotz des Konsums von säurehaltigen Getränken, okklusaler Parafunktionen und bestehenden Mundhygienehabits die Speicheldrüsenfehlfunktion der Patienten den Hauptgrund für den vorzeitigen Zahnabrieb darstellt (Young *et al.*, 2001). Hannig *et al.* fanden heraus, dass bei bestrahlten Tumorpatienten neben der Speichelfließrate auch der Anteil von prolinreichen Proteinen im Speichel gegenüber unbestrahlten Probanden sank (M. Hannig, Dounis, Henning, Apitz, & Stösser, 2006). Aus diesem Grund war die spezielle Anamnese zum Ausschluss von Erkrankungen oder Beeinträchtigungen, die die Speichelqualität oder -quantität beeinflussen, von Wichtigkeit.

Bevor die experimentelle Phase begann, wurden die Probanden auf eine regelmäßige Nahrungsaufnahme vor den intraoralen Tragezeiten hingewiesen. Unerwünscht war die Ausbildung einer „Hungerpellikel“. Bei einer Untersuchung von Personen, die sich in einer lacto-vegetarischen Diät befanden, war der pH-Wert des Speichels niedriger als in der Kontrollgruppe (Linkosalo, Ohtonen, Markkanen, Karinpää, & Kumpusalo, 1985). Nach 24 Stunden Fasten hat eine Pellikel die gleiche Zusammensetzung wie eine 2-Stunden-Pellikel. Einen Einfluss des Fastens auf die Pellikelformation oder eine bakterielle Degradation der Pellikel wird deswegen von Rykke und Sønju angenommen (Rykke & Sønju, 1991).

Diskussion

5.1.5 Abrasion

Die Versuchsreihen umfassten eine Kontrollgruppe ohne Pellikel, eine Gruppe der in vitro gebildeten Pellikel mit und ohne Polyphenolapplikation und eine Gruppe der in vivo gebildeten Pellikel mit und ohne Polyphenolapplikation.

Die in die Untersuchungen einbezogenen Zahnpasten European (Eu) Signal (0,32% Natriumfluorid, hydrated silica, Elida Fabergé, UK) und Chinese (Ch) Signal (Kalziumkarbonat, Elida Fabergé, UK) hatten RDA-Werte von 90 bzw. 204 und REA-Werte von 4,1 bzw. 2,1. Ähnliche Zahnpasten mit vergleichbaren RDA-Werten finden sich unter anderem bei Addy *et al.* (Addy *et al.*, 2002), Hooper *et al.* (Hooper *et al.*, 2003) und Philpotts *et al.* (Philpotts *et al.*, 2005). Die Abrasion kann durch verschiedene Methoden in vitro bestimmt werden. Die relative Dentin-Abrasions-Methode (RDA) nach Hefferren wird von den Herstellern der Zahnpasten im Allgemeinen verwendet (Hefferren, 1976). In einigen der bisher durchgeführten Studien konnte eine direkte Abhängigkeit zwischen RDA-Wert und Zahnhartsubstanzverlust festgestellt werden (Addy *et al.*, 2002; Hooper *et al.*, 2003). Im Rahmen der In-situ-Studien von Pickles *et al.* konnten hingegen nach einem Zeitraum von 24 Wochen zwischen Zahnpasten mit RDA-Werten von 90 bzw. 204 sowohl auf Schmelz als auch auf Dentin keine signifikanten Unterschiede im Hinblick auf die Abrasion nachgewiesen werden (Pickles *et al.*, 2005). Ein frühes Experiment von Volpe *et al.* aus dem Jahr 1975, der ebenso eine In-situ-Studie über 54 Monate an 120 Probanden mit zwei unterschiedlich abrasiven Zahnpasten durchführte, bestätigt, dass keine direkte Korrelation zwischen dem im Labor ermittelten RDA-Wert und der klinischen Situation existent war (Volpe, Mooney, Zumbrunnen, Stahl, & Goldman, 1975).

Die Zahnpasten wurden mit Polymer Lösung (1% Natrium-Carboxymethyl-Zellulose) und Pufferlösung in einer Gewichtsrelation von 1:1:1 gemischt und eine Stunde vor ihrer Verwendung angesetzt. Die Verdünnung der Pasten soll den In-vivo-Bedingungen entsprechen. Untersuchungen von Franzò *et al.* belegen, dass eine Verdünnung der Zahnpasten durch Wasser und Speichel während des Zähneputzens stattfindet und somit in Abrasionsexperimente einfließen sollte (Franzò *et al.*, 2010). Hannig und Bößmann bescheinigen der Verdünnung des Putzgemisches mit künstlichem Speichel in ihren In-vitro-Untersuchungen eine entscheidende Bedeutung für den Erhalt des Zahnoberhäutchens beim

Diskussion

Zähneputzen (M. Hannig & Bössmann, 1988a). Sie konstatieren ähnlich wie Duke und Forward, dass in der Mundhöhle bereits 30 Sekunden nach Beginn des Zähneputzens eine Verdünnung der Zahnpasta mit Speichel im Verhältnis von 1:4 eintritt und schon zu diesem Zeitpunkt nur noch eine geringe Abrasion des Zahnoberhäutchens stattfinden kann (Duke & Forward, 1982).

Die Zahnbürste hatte in der vorliegenden Studie einen flachen ebenmäßigen Schnitt (Bürstenhaardurchmesser 0,2 mm, Bürstenhaarlänge 12 mm), und auf den Bürstenkopf wirkte ein Gewicht von 300 g (± 5 g) ein. Voronets *et al.* untersuchten in einer In-vitro-Studie erodierte humane Schmelzproben nach dreistündiger Pellikelbildungszeit unter dem Einfluss einer weichen und harten Zahnbürste auf das Maß ihres Zahnhartsubstanzverlustes und konnten keine signifikanten Differenzen herausstellen (Voronets, Jaeggi, Buerger, & Lussi, 2008). Van der Weijden *et al.* ließ im Rahmen einer Studie die Versuchspersonen mit einem Anpressdruck von bis zu 300 Gramm putzen und fand heraus, dass sich keine signifikante Abhängigkeit zwischen der Putzkraft und der Effizienz der Plaquebeseitigung nachweisen ließ (Van der Weijden, Timmerman, Reijerse, Snoek, & Van der Velden, 1996). Bis zu einer bestimmten Größe der Kraft war ein nicht linearer Anstieg der Putzeffektivität zu beobachten. Die „Übergangskraft“ lag in der Untersuchung bei 407,4 Gramm. Jenseits dieses Wertes resultierte die Anwendung höherer Kräfte in einer verminderten Beseitigung der Plaque (Van der Weijden *et al.*, 1998). Im Mittel beobachteten Van der Weijden *et al.* hauptsächlich „Putz-Kräfte“ von 267 Gramm und 330 Gramm (Van der Weijden *et al.*, 1996; 1998). Heasman *et al.* (Heasman *et al.*, 1999) stellte „Putz-Kräfte“ von 297 Gramm fest und Mierau *et al.* konstatierte in Untersuchungen zu multiplen gingivalen Rezessionen eine „Putz-Kraft“ von 375 Gramm (Mierau, Haubitz, & Völk, 1989).

Die Bürstgeschwindigkeit betrug in der vorliegenden Studie 25 Vor- und Rückwärtsbewegungen in 10 s auf einer Distanz von ca. 5 cm. Die Auswahl der Putzbedingungen erfolgte entsprechend dem Muster des durchschnittlichen Putzverhaltens einer erwachsenen Person. Wiegand und Attin (2011) verglichen im Rahmen einer Übersichtsarbeit 42 In-vitro- und 20 In-vivo-Studiendesigns im Hinblick auf die Simulation klinischer Bedingungen. Sie stellten dabei fest, dass in einigen der Studien die Proben innerhalb der Putzzyklen tendenziell einer unverhältnismäßigen hohen Frequenz und Wiederholung unterlagen (≥ 100 Putzbewegungen/Zyklus) (Wiegand & Attin, 2011). Sie verweisen in diesem Zusammenhang nicht nur auf ein höheres Maß an Abnutzung, sondern stellten auch die Simulation eines adäquaten protektiven Effekts der Pellikel in Folge der

Diskussion

überhöhten Putzzeit in Frage. Saxer und Heasman fanden durchschnittliche In-situ-Putzzeiten von 83,5 beziehungsweise von 90 Sekunden (Heasman et al., 1999; Saxer, Barbakow, & Yankell, 1998). Die reale Putzdauer liegt laut Hooper *et al.* bei 5 Sekunden zweimal täglich pro Glattfläche eines Zahnes (Hooper et al., 2003).

5.1.6 Mess- und Analysemethoden

Die Schmelzoberflächen wurden vor den Putzexperimenten zur Bestimmung des Abtrages mit Knoop-Diamanten an 4 Stellen jeweils markiert und vermessen (C. Hannig et al., 2009a; Voronets et al., 2008). Diese Methode der sich verändernden Tiefengeometrie wurde bereits von Murray *et al.* (1986) auf Acryl mit Hilfe von Vickers-Diamanten beschrieben (Murray, McCabe, & Storer, 1986). Jaeggi & Lussi (1999) und Joiner *et al.* (2004) weiteten diese Methode auf die Anwendung am Schmelz aus (Jaeggi & Lussi, 1999; Joiner, Pickles, Tanner, Weader, & Doyle, 2004b; Joiner, Weader, & Cox, 2004c). Da der Zahnschmelz von Natur aus einen sehr harten und spröden Werkstoff darstellt, ist der Eindruckdiamant nach Knoop wegen seiner geringen Eindringtiefe sehr gut geeignet für die Messung.

Diese Vorgehensweise stellt in vielen Studien sowohl auf gesundem als auch auf erodiertem Schmelz die Methode der Wahl dar und zeigt die nötige Sensitivität, um Mikromengen des Abriebes zu bestimmen.

Die Methode der Oberflächenvermessung des Dentins mit einem Profilometer wurde von Davis (1979) untersucht und mit der „Radiotracer“-Methodik verglichen. Heutzutage wird die profilometrische Technik zur quantitativen Beurteilung des Dentinabtrages häufig benutzt (Addy et al., 2002; Attin et al., 2004; Ganss, Klimek, & Schwarz, 2000; Hooper et al., 2003; Moore & Addy, 2005; Philpotts et al., 2005; West et al., 1998). Sie kann auch relativ kleine Mengen des Dentinabriebes bestimmen.

5.1.7 TEM-Analyse

Das TEM-Analyse stellt die Methode der Wahl dar, um die ultrastrukturelle Vielfalt der Pellikelschichten zu erfassen (C. H. Berthold, Berthold, & Nord, 1979; M. Hannig, 1997; Lie, 1977; Nyvad & Fejerskov, 1987). Neben dieser Technik können auch Untersuchungen zur Erfassung der Pellikelstrukturen mit Hilfe von Kryo-Elektronenmikroskopie (Schüpbach et

Diskussion

al., 1996; 2001), Konfokalmikroskopie (CLSM) (Amaechi et al., 1999) und Rasterelektronenmikroskopie durchgeführt werden.

Durch die Verwendung von Ultradünnschnitten kann eine Analyse von einer Vielzahl von Pellikelabschnitten erfolgen und der schichtweise Aufbau studiert werden. Die derzeitige maximale Auflösungsgrenze liegt bei 0,05 nm bei den leistungsstärksten Transmissionselektronenmikroskopen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Pellikelschichten auf Dentinoberflächen untersucht. Dies stellte eine besondere Herausforderung bei der Präparation und Vorbereitung der Proben dar, da die Zahnhartsubstanz Dentin im unentkalkten Zustand vergleichsweise schwer ultradünn zu schneiden ist. Die Pellikeldicken wurden im TEM bestimmt. Im Vordergrund stand jedoch der Gesamteindruck der Pellikelauflagerung, sprich eine qualitative Untersuchung als Ergänzung zur Tiefenunterschiedsmessung.

5.1.8 Polyphenole

Polyphenole haben jüngst sehr viel Aufmerksamkeit durch die Medien erfahren. Neben den Ernährungswissenschaftlern sind sie nun auch bei den Medizinern in den Fokus des Interesses gerückt. Nun wurden bis dato einige Anstrengungen unternommen, ihre Vielfalt von Watzl und Rechkemmer zu kategorisieren und ihre Wirkung auf den menschlichen Organismus zu untersuchen (Watzl & Rechkemmer, 2001; 2002). In welcher Form die Polyphenole dabei auf unsere Gesundheit Einfluss nehmen könnten, wird derzeit wissenschaftlich beleuchtet. Der Konsum von Polyphenolen in Getränken geschieht über den Tee-, Wein- und Kaffeegenuss. Studien zufolge haben Polyphenole auf unser Herz-Kreislaufsystem einen positiven Einfluss und könnten daher in Zukunft in der Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen eingesetzt werden. Droebner *et al.* bestätigten in Untersuchungen, dass sich durch ein polyphenolreiches Pflanzenextrakt namens CYSTUS052 eine Wirkungsverstärkung auf die Anti-influenza-Virus-Aktivität ausüben lässt (Droebner et al., 2007).

Aus Sicht der Zahnmedizin gab es in der Vergangenheit Untersuchungen zum anti-kariogenen und antimikrobiellen Verhalten von Teepolyphenolen. Hannig *et al.* (C. Hannig, Spitzmüller, Al-Ahmad, & Hannig, 2008b) untersuchten die Aktivität von Amylase, Lysozym, Glykosyltransferasen und Peroxidasen in der In-situ-Pellikelschicht nach Behandlung mit Cistus-Tee über zehn Minuten. Dabei konnte festgestellt werden, dass sich die Bakterienmenge in der 120 min-Pellikelschicht unter dem Einfluss von Cistus-Tee signifikant

Diskussion

reduziert hatte. Weitere Studien bestätigen die reduzierte Kolonisation der Mundhöhle mit Mikroorganismen, insbesondere die Anheftung von *Streptococcus mutans*, unter dem Einfluss polyphenolhaltiger Agenzien (Ferrazzano et al., 2009; Hamilton-Miller, 2001; Hattori et al., 1990; Limsong, Benjavongkulchai, & Kuvatanasuchati, 2004; Rasheed & Haider, 1998; Rosen et al., 1984). Dieser antibakterielle Effekt konnte auch in weiteren Studien von Smullen *et al.* (Smullen et al., 2007) *in vitro* und von Otake *et al.* (Otake et al., 1991) am Tiermodell beobachtet werden.

Polyphenole reduzieren die Produktion von Säureverbindungen und die Möglichkeit der Streptokokken, adhärente wasserunlösliche Glukane aus Saccharose mit Hilfe von Glykosyltransferasen zu synthetisieren (Hattori et al., 1990; Matsumoto et al., 1999; Ooshima, Minami, Aono, Tamura, & Hamada, 1994a; Ooshima, Yoshida, & Hamada, 1994b). Polyphenole aus der *Camellia sinensis*, genannt Sunphenon, vermindern die Zelllebensdauer von *Streptococcus mutans* (Saito, 1990). Das zelluläre Attachment von *Streptococcus mutans* auf speichelbehandelten Hydroxylapatitoberflächen ist signifikant reduziert, wenn die Streptokokken mit Polyphenolen vorbehandelt werden (C. Hannig, Sorg, Spitzmüller, Hannig, & Al-Ahmad, 2009b). Hamilton-Miller nimmt an, dass diese antibakterielle Aktivität auf Catechine zurückzuführen ist (Hamilton-Miller, 2001). Dagegen besagt eine Untersuchung unter Ooshima *et al.*, dass Oolong Tee-Extrakte in Form einer Mundspülung signifikant die Plaqueakkumulation *in vivo* verringern, aber keinen signifikanten Effekt auf die Anzahl der Mutans-Streptokokken haben (Ooshima, Minami, Aono, Tamura, & Hamada, 1994a).

Auf die De- und Remineralisation von Schmelzoberflächen scheinen die Polyphenole laut den Studien von Li *et al.* keinen Einfluss zu haben (Li et al., 2004b).

Die bis dato publizierten Studien zum Einfluss von Polyphenolen auf das Abrasionsverhalten von Dentin stammen von Magalhães *et al.* (Magalhães et al., 2009) und Kato *et al.* (Kato et al., 2009). Demnach konnte in beiden Studien eine positive Korrelation zwischen dem Konsum von grünem Tee und einer Reduktion des Dentinverlustes beim Zähneputzen festgestellt werden. Kato *et al.* exponierten die Proben viermal täglich für je 1 Minute in grünem Tee. In der vorliegenden Studie lagen die Kontaktzeiten mit Tee dagegen mit 2x5 Minuten bzw. 2x15 Minuten höher.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Abrasionsmessungen auf Zahnschmelz

Anhand der Tiefenunterschiedsmessungen konnte in der vorliegenden Studie eine statistisch signifikante Verringerung der Abrasionsdaten in der Gruppe der In-vitro-Pellikel (RDA 90, Signal Europa) verglichen mit der nicht pellikelbelegten Kontroll-Oberfläche (Kontrolle, RDA 90, Signal Europa) festgestellt werden.

Die Tatsache, dass kein direkter Bezug zwischen dem RDA-Wert einer Zahnpasta und der zu erwartenden Abrasion in unserer Studie hergestellt werden konnte, bestätigt unter anderem die Untersuchungen von Pickles *et al.* (2005). In diesen Untersuchungen ließen sich nach einem Zeitraum von 24 Wochen beim Vergleich von Zahnpasten mit RDA-Werten von 90 und 204 sowohl auf Schmelz als auch auf Dentin unter dem Einfluss einer Pellikel keine signifikanten Unterschiede in der Abrasion nachweisen (Pickles *et al.*, 2005). Nach circa vier Wochen wurde ein Plateau der Abrasion erreicht, das als ein Hinweis auf die protektive Kraft der Pellikel gedeutet werden könnte. Andere Autoren vermuten, dass durch die Fluoride in den Zahnpasten die Schmelzoberfläche gehärtet wird und der Abrasion bis zu einem gewissen Maß entgegensteuert oder unterschiedliche Mineralisationsgrade der humanen Proben Anteil daran tragen könnten (Duckworth, 1993; Shellis & Duckworth, 1994). Dementgegen stehen die Messungen von Philpotts *et al.* (2005), bei dem sich eine direkte Linearität zwischen RDA-Wert und Abrasion gezeigt hatte. Doch in diesem Fall müssen insbesondere die extensiven Putzzeiten von sechs Minuten täglich und die fehlenden Pellikelschichten berücksichtigt werden, die die Übertragbarkeit solcher Ergebnisse auf den klinischen Alltag fraglich erscheinen lassen (Philpotts *et al.*, 2005).

In den ersten fünf Tagen ihrer Untersuchung stellten Hooper *et al.* fest, dass die Schmelzabrasion höher war, als in den darauffolgenden fünf Tagen (Hooper *et al.*, 2003). Im Vergleich mit den Abrasionsdaten unserer Studie konnten Hooper *et al.* nach 10 Tagen auf Zahnschmelz einen wesentlich höheren Abrieb messen, was mutmaßlich an den längeren Putzintervallen liegt. Ebenso scheint laut Meurmann und Frank *et al.* eine mögliche Erklärung zu sein, dass die Politur der Proben zu einem aktiven Abtrag der Oberfläche führt (Meurman & Frank, 1991). Auch Ganss *et al.* vermuten, dass die polierten Schmelzproben mehr Materialverluste provozieren, als der natürliche Schmelz (Ganss *et al.*, 2000). Verbliebene

Diskussion

Mikrokratzer und Mikrorisse in der polierten Oberfläche können als Initiator für den Abrieb in der frühen Phase verantwortlich gemacht werden. In kürzeren Studien zeigen sich deshalb tendenziell höhere Abrasionswerte als in Langzeitstudien.

Lendenmann *et al.* vermuten, dass neben der Oberflächengüte des Schmelzes die Pellikelbildung und –reifung die Zahnhartsubstanzverluste reduzieren (Lendenmann *et al.*, 2000). Beim Vergleich der Abrasionswerte zwischen der Kontrollgruppe (ohne Pellikel, RDA 90, Signal Europa) und der Gruppe mit In-situ-Pellikel (RDA 90, Signal Europa) zeigt sich ein signifikanter Unterschied. Jaeggi und Lussi konnten nach Verwendung einer Zahnpasta mit RDA=77/ REA=4,5 einen Schmelzabtrag zwischen 0,19-0,26 μm feststellen (Jaeggi & Lussi, 1999). In Anbetracht der Tatsache, dass es sich hierbei um erosionsbehandelte Proben nach einer Pellikelbildungszeit von nur einer Stunde handelte, lässt sich der Unterschied zum Abtrag von nur 0,03 μm in unserer Versuchsreihe erklären. Der Vergleich der Studien gibt weiterhin Hinweise auf die protektive Wirkung der Pellikelschicht.

Unsere Ergebnisse einer signifikant reduzierten Abrasion beim Vergleich der Schmelzproben mit In-vitro-Pellikel und In-situ-Pellikel können in Einklang mit Studien von Murray *et al.* (1986) gebracht werden, die zeigen, dass die Abrasion auf den Proben unter In-situ-Bedingungen geringer ausfiel als in der vergleichbaren In-vitro-Versuchsreihe (Murray *et al.*, 1986).

Der Zahnhartsubstanzverlust ist multifaktoriell, wobei physikalische und chemische Prozesse berücksichtigt werden müssen (Mair, 1999). Wie Lambrechts *et al.* im Vergleich von verschiedenen Methoden zur Simulation des Zahnverschleißes herausfanden, ist es schwer möglich, alle Variablen, die einen Einfluss auf das System nehmen, zu kontrollieren (Lambrechts *et al.*, 2006). Problematisch wird es, das Zusammenspiel der Vielzahl an biologischen Faktoren unter In-vitro-Bedingungen zu imitieren.

In unserer Studie führte die Applikation der Polyphenole (Schwarztee) zu keinem signifikanten Einfluss auf den Schmelzabrieb. Vergleichsstudien fehlen bis zum jetzigen Zeitpunkt. Auf einer Zahnschmelzoberfläche konnte die protektive Wirkung der Pellikelschicht durch Schwarzteekomponenten unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht weiter positiv beeinflusst werden. Hier ist davon auszugehen, dass die Härte des Zahnschmelzes und die Pellikelschicht allein eine genügend hohe Abrasionsresistenz entwickeln können.

Diskussion

5.2.2 Abrasionsmessungen auf Dentin

Dentin hat eine um den Faktor 3,6-5,7 geringere Härte aufzubieten als Zahnschmelz. Dies muss zwangsläufig zu höheren Abrasionswerten innerhalb dieser Versuchsreihen führen. Im Überblick zeigen die Ergebnisse, dass eine In-situ-Pellikelschicht sowohl unter der Einwirkung der niedrigabrasiven als auch der hochabrasiven Zahnpasta signifikant den Abrieb verringern kann. Der Lubrikationseffekt und die Widerstandsfähigkeit der adsorbierten Pellikel gegenüber der Reinigung durch Zahnpasta scheinen wichtige Faktoren für die Verringerung der Abrasionswirkung zu sein (I. C. Berg et al., 2003). In der Literatur wird über ähnliche Ergebnisse berichtet. Beispielsweise haben Addy *et al.* in einer In-situ-Studie mit Pasten vergleichbarer RDA-Werte (RDA 85 und 189) äquivalente Dentinverluste verzeichnet (Addy et al., 2002). Toleranzbreiten in der 10-tägigen Untersuchung von 0,36-1,97 μm (Zahnpaste mit RDA 85) und von 0,19-10,36 μm (Zahnpaste mit RDA 189) sind der Beweis für eine große interindividuelle Variabilität. Wie Pickles *et al.* feststellen konnten, kann für die zu erwartende Abriebhöhe keine genaue Vorhersage gemacht werden (Pickles et al., 2005). Es kann zurzeit konstatiert werden, dass die In-situ-Pellikelschicht auf Dentin auch einer In-vitro-Pellikel signifikant im Hinblick auf die Verminderung der Abrasion überlegen ist. Dies wird auf Unterschiede in der Pellikelformation (M. Hannig, 2002) und in den Fluoridierungseffekten an der Dentinoberfläche (Ganss, Klimek, Schäffer, & Spall, 2001) zurückgeführt.

Die Polyphenolpräsenz führte auf den Dentinproben sowohl unter der Einwirkung von niedrig- und hochabrasiven Zahnpasten als auch bei verschiedenen Kontaktzeiten mit schwarzem Tee auf den In-situ-Proben zu niedrigeren Abrasionswerten, aber zu keinen signifikanten Veränderungen. Dies steht im Gegensatz zu den Studien von Magalhães *et al.* und Kato *et al.*, die auf bovinem erodiertem Dentin eine geringere Abrasion unter Polyphenoleinwirkung beobachteten (Kato et al., 2009; Magalhães et al., 2009). Auf unseren unerodierten humanen Dentinoberflächen konnte die abrasionsprotektive Wirkung einer Pellikelschicht durch Schwarzteekomponenten nicht signifikant beeinflusst werden.

Die erhöhten Standardabweichungen zeigen, dass der Einfluss von unbekannten externen Faktoren, wie z.B. instabiler Polyphenolgehalt der Tee's (Y.-S. Lin, Tsai, Tsay, & Lin, 2003) oder unterschiedliche Mineralisierungsgrade der Dentinproben, stärker hinterfragt und bei künftigen Studien berücksichtigt werden muss.

Diskussion

5.2.3 TEM-Analysen

Die variable Ultrastruktur der äußeren Pellikelschicht spiegelt die komplexen Prozesse der Adsorption und Desorption wider, die zur Pellikelbildung beitragen. Deswegen ist es nicht möglich, die exakte Pellikelenddicke durch transmissionselektronenmikroskopische Analysen zu bestimmen (M. Hannig & Joiner, 2006).

Kaum eine Studie erlaubt eine „Echtzeitanalyse“ von Adsorptions- und Desorptionsraten oder die native Determination von strukturellen Merkmalen der adsorbierten Schichten. Einzig das Verfahren der Ellipsometrie kann die Schichtstärke der adsorbierten Speichelproteinschicht auf ausgewählten Substrat-Oberflächen messen (Ericson, Pruitt, Arwin, & Lundström, 1982; Vassilakos et al., 1992a; 1993). Erst durch TEM-Analysen konnte jedoch von Hannig und Balz gezeigt werden, dass die Pellikel aus einer elektronendichten Basalschicht und einer äußeren, locker granulären und zum Teil globulären Pellikelschicht besteht (M. Hannig & Balz, 1999).

Wie zu erwarten war, zeigten die Kontrollproben im Rahmen der TEM-Analyse bis auf einen zum Teil auf den Oberflächen haftenden smear layer keine Auflagerungen und wiesen zum Teil eine Freilegung der Kollagenfibrillen aus ihrem Dentinverbund auf.

Im Vergleich der Pellikelschichten auf Dentin der In-vitro- und der In-situ-Gruppe lässt sich feststellen, dass die Dicke der Pellikel stark variiert. Im Mittelwert betragen die Pellikelschichten bis zu 50 nm auf den Präparaten, die in vivo getragen worden waren. Dies erscheint in Übereinstimmung mit einer Studie von Hannig, in der Schmelzproben nach sechsstündiger In-situ-Pellikelbildung ex vivo geputzt wurden (M. Hannig, 2002). Die TEM-Analyse zeigte eine Reduktion der Pellikel auf eine 1-30 nm dicke, unvollständige Basalschicht ohne globuläre Auflagerungen.

Die In-vitro-Gruppe zeigte im Mittel eine Pellikelstärke von 5-10 nm. Diese Pellikeldicken entsprechen ungefähr der Stärke der Pellikel, die einer Zahnoberfläche nach wenigen Minuten im intraoralen Milieu in Form der sogenannten elektronendichten Basisschicht anhaftet (M. Hannig, 1999). In Abhängigkeit von der Lokalisation und unter Berücksichtigung interindividueller Unterschiede kann eine 2-Stunden-Pellikel laut Untersuchungen von Hannig (1999) durch Adsorption von Proteinaggregaten eine Stärke von 100-500 nm aufweisen. Vermutet werden kann, dass die äußere, granuläre Schicht durch die mechanische Reinigung mittels Zahnbürste und -paste entfernt worden ist, während die Pellikelbasisschicht

Diskussion

erhalten blieb. Sie ist in Bezug auf abrasive Agenzien eine sehr resistente Barriere und schützt die Oberfläche effektiver, als die äußere Schicht der Pellikel (M. Hannig & Bössmann, 1988b; 1988a).

Generell ist im Rahmen der TEM-Analysen kein eindeutiger Unterschied zwischen den Pellikelresiduen nach niedrig- und hochabrasiven Zahnpastenbehandlungen erkennbar. In einigen Regionen der Dentinproben konnten nur noch Pellikelreste bzw. gar keine Pellikel mehr dargestellt werden. Auffallend war die gleichmäßige, intakte und homogene Dentinoberfläche der Präparate aus der In-situ-Gruppe. Hier scheint die Pellikelformation besonders protektiv gegenüber den Abrasivstoffen der Zahnpasten zu wirken. Die elektronenoptischen Aufnahmen unterstützen hier die Ergebnisse der Tiefenunterschiedsmessungen, die eine statistische Signifikanz der Dentinabrasion beim Vergleich der Kontrollgruppe und der In-situ-Pellikel aufweisen.

Die Überlegung, dass das protektive Potential einer in vivo gebildeten Pellikelschicht der in vitro gebildeten Pellikel hier überlegen zu sein scheint, wird gestützt durch frühere Untersuchungen (Al-Hashimi & Levine, 1989; Carlén et al., 1998; Yao et al., 2001). Carlen *et al.* (Carlén et al., 1998) schreiben der lokalen intraoralen Verfügbarkeit von Speichelbiopolymeren eine hohe Bedeutung für die Formation und Zusammensetzung der In-situ-Pellikelschicht zu, die durch die Inkubation von Schmelzproben in Speichel unter In-vitro-Bedingungen nicht „nachgebildet“ werden kann.

In der Gruppe der In-vitro-Proben unter dem Einfluss von Polyphenolen zeigt sich ein Anstieg der elektronendichten Auflagerungen auf 450 nm bis hin zu 2,5 µm, die sehr homogen formiert sind. Der Anstieg der Pellikeldicke im In-vitro-Versuch kann auf eine mögliche Inkorporation der Polyphenole in die Pellikel und die Ausfällung von Proteinaggregaten zurückzuführen sein. Untersuchungen zu diesem Phänomen ergaben eine Anreicherung von Chromogenen auf der Zahnoberfläche nach Kontakt mit schwarzem Tee (Addy & Moran, 1984; Sheen, Banfield, & Addy, 2001). Joiner *et al.* haben in ihrer ellipsometrischen Untersuchung zur Bindungsaffinität von Polyphenolen aus schwarzem Tee zeigen können, dass sich unter Zugabe von Polyphenolen eine Verdoppelung der adsorbierten Gesamtproteinmenge auf einer Hydroxylapatit-Oberfläche erzeugen lässt (Joiner et al., 2003). Verantwortlich dafür sind laut Yan und Bennick vor allem Histatin und prolinreiche Proteine, die zu einer Ausfällung mit Tanninen führen können (Yan & Bennick, 1995), was von Proctor und Carpenter bestätigt wurde (Carpenter et al., 2005; Proctor et al., 2005). Spekuliert wird über eine reversible Bindung an Speichelproteine, die die Adsorptionsrate von Polyphenolen

Diskussion

über elektrostatische Anziehungskräfte erhöht (Joiner et al., 2006). Nach Spülung der Oberflächen mit Pufferlösung und SDS war eine signifikant geringere Löslichkeit der Proteine aus der Pellikel zu beobachten, wenn sie mit schwarzem Tee oder Rotwein vorbehandelt worden waren.

Die Proben der In-situ-Gruppe weisen unter dem Einfluß von Schwarztee eine durchschnittliche Pellikeldicke von 40-80 nm auf. Zum Teil sind auf den Dentinoberflächen nach dem Putzen nur noch Residuen bzw. gar keine Pellikelreste mehr auszumachen. Beim Vergleich der In-situ-Präparate mit und ohne Polyphenoleinwirkung war eine messbare Verringerung der Abrasion nach Teekontakt festzustellen, aber eine statistische Signifikanz konnte nicht ermittelt werden.

5.3 Schlussfolgerung und klinischer Bezug

Anhand der Messungen zur Bestimmung des Zahnhartsubstanzverlustes von Zahnschmelz und Dentin kann konstatiert werden, dass eine Pellikel signifikant vor Abrasion schützen kann. Unter den gewählten Versuchsbedingungen (handelsübliche Zahnpasta und Zahnbürste, Orientierung am durchschnittlichen Maß an Kraft- und Zeitaufwand während der Reinigung) konnte gezeigt werden, dass eine Pellikelschicht die Auswirkungen der Abrasion zwar nicht vollständig verhindern, aber reduzieren kann.

Der Einsatz zweier unterschiedlicher abrasiver Zahnpasten hat in guter Übereinstimmung mit anderen Studien demonstriert, dass im Hinblick auf das Abrasionsergebnis sowohl auf Schmelz als auch auf Dentin kein signifikanter Unterschied zu verzeichnen war.

Der Vergleich zwischen einer in vitro und in vivo gebildeten Pellikelschicht erbrachte einen messbaren signifikanten Unterschied. Das abrasionsprotektive Potential einer nach intraoralen Exposition gebildeten Pellikel erwies sich sowohl auf Schmelz als auch auf Dentin als bedeutender Faktor. Die Dentinoberfläche war durch die Adsorption der Speichelproteine in situ im Durchschnitt zwei Mal widerstandsfähiger gegenüber der Pastenabrasion als eine vergleichbare Pellikelschicht, die in vitro entstand.

Die Darstellung der Dentinoberflächen im Rahmen der transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchung (TEM) bestätigt die Relevanz der Pellikelschicht in Bezug auf die abrasionsprotektive Wirkung. Die TEM-Bilder präsentieren eine Momentaufnahme des Zusammenspiels zwischen Adsorption und Desorption an der Dentinoberfläche. Sie enthalten Hinweise auf Struktur und Aussehen der Pellikel, sollten jedoch nicht losgelöst von

Diskussion

den quantitativen Ergebnissen überbewertet werden. Pellikelschichten von bis zu 50 nm auf den Präparaten, die in vivo getragen worden waren, entsprechen ungefähr der Stärke der Basispellikel, die auf einer Zahnoberfläche nach wenigen Minuten im intraoralen Milieu durch den Kontakt mit Speichel anhaftet (M. Hannig, 1999). Im Vergleich zur In-situ-Gruppe fiel die mittlere Pellikelschichtdicke auf den Präparaten der In-vitro-Reihe mit 5-10 nm deutlich geringer aus und spiegelt die Messergebnisse wider.

Die Einwirkung der Polyphenole des schwarzen Tee's zeigte keine signifikanten Effekte. Trotz der erheblich massiveren Pellikeldicken im In-vitro-Versuch unter dem Einfluss von Schwarztee konnte kein Zusammenhang zwischen der Modifikation der Pellikel und dem Abriebverhalten hergestellt werden. Tendenziell zeigte sich in der In-situ-Versuchsgruppe eine Verringerung der Abrasionswerte auf Dentinoberflächen nach der Behandlung mit Schwarztee.

Bezüglich des klinischen Bezuges lässt sich festhalten, dass die Ausbildung einer intraoralen Pellikelschicht ein effektives abrasionsprotektives Potential sowohl auf dem Zahnschmelz als auch auf dem Dentin entwickeln kann. Zum Schutz des Zahnhartsubstanzen im Rahmen der täglichen häuslichen Mundhygiene bedarf es weitere Studien zur Erforschung des Einflusses von polyphenolhaltigen Pflanzenstoffen auf die Pellikel.

6 Literaturverzeichnis

1. Addy, M., & Moran, J. (1984). The formation of stain on acrylic surfaces by the interaction of cationic antiseptic mouthwashes and tea. *Journal of Biomedical Materials Research*, 18(6), 631–641.
2. Addy, M., Hughes, J., Pickles, M. J., Joiner, A., & Huntington, E. (2002). Development of a method in situ to study toothpaste abrasion of dentine. Comparison of 2 products. *Journal of Clinical Periodontology*, 29(10), 896–900.
3. Aguirre, A., Mendoza, B., Levine, M. J., Hatton, M. N., & Douglas, W. H. (1989). In vitro characterization of human salivary lubrication. *Archives of Oral Biology*, 34(8), 675–677.
4. Aherne, S. A., & O'Brien, N. M. (2002). Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 18(1), 75–81.
5. Al-Hashimi, I., & Levine, M. J. (1989). Characterization of in vivo salivary-derived enamel pellicle. *Archives of Oral Biology*, 34(4), 289–295.
6. Allan, K., & Devereux, G. (2011). Diet and asthma: nutrition implications from prevention to treatment. *Journal of the American Dietetic Association*, 111(2), 258–268.
7. Amaechi, B. T., Higham, S. M., Edgar, W. M., & Milosevic, A. (1999). Thickness of acquired salivary pellicle as a determinant of the sites of dental erosion. *Journal of Dental Research*, 78(12), 1821–1828.
8. Armstrong, W. G. (1968). Origin and nature of the acquired pellicle. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, 61(9), 923–930.
9. Armstrong, W. G. (1970). Amino acid composition of human parotid salivary proteins selectively adsorbed by hydroxyapatite. *Archives of Oral Biology*, 15(10), 1001–1003.
10. Attin, T., Siegel, S., Buchalla, W., Lennon, A. M., Hannig, C., & Becker, K. (2004). Brushing abrasion of softened and remineralised dentin: an in situ study. *Caries Research*, 38(1), 62–66.
11. Bagchi, D., Sen, C. K., Ray, S. D., Das, D. K., Bagchi, M., Preuss, H. G., & Vinson, J. A. (2003). Molecular mechanisms of cardioprotection by a novel grape seed proanthocyanidin extract. *Mutation Research*, 523-524, 87–97.
12. Bani, D., Giannini, L., Ciampa, A., Masini, E., Suzuki, Y., Menegazzi, M., et al. (2006). Epigallocatechin-3-gallate reduces allergen-induced asthma-like reaction in sensitized guinea pigs. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 317(3), 1002–1011.
13. Barbour, M. E., & Rees, G. D. (2006). The role of erosion, abrasion and attrition in tooth wear. *The Journal of Clinical Dentistry*, 17(4), 88–93.
14. Beecher, G. R., Warden, B. A., & Merken, H. (1999). Analysis of tea polyphenols. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, 220(4), 267–270.
15. Bennick, A. (1977). The binding of calcium to a salivary phosphoprotein, protein C, and comparison with calcium binding to protein A, a related salivary phosphoprotein. *Biochemistry Journal*, 163(2), 241–245.
16. Bennick, A., Cannon, M., & Madapallimattam, G. (1979). The nature of the hydroxyapatite-binding site in salivary acidic proline-rich proteins. *Biochemistry Journal*, 183(1), 115–126.
17. Bennick, A., Chau, G., Goodlin, R., Abrams, S., Tustian, D., & Madapallimattam, G. (1983). The role of human salivary acidic proline-rich proteins in the formation of acquired dental pellicle in vivo and their fate after adsorption to the human enamel surface. *Archives of Oral Biology*, 28(1), 19–27.
18. Berg, I. C., Rutland, M. W., & Arnebrant, T. (2003). Lubricating properties of the initial

Literaturverzeichnis

- salivary pellicle--an AFM study. *Biofouling*, 19(6), 365–369.
19. Berthold, C. H., Berthold, P., & Nord, C. E. (1979). Electron microscopy and immunoperoxidase staining of *Streptococcus mutans* during controlled growth in two different media. *Acta Pathologica Et Microbiologica Scandinavica. Section B, Microbiology*, 87B(1), 21–28.
 20. Berthold, P. (1979). Formation of salivary coating and dental plaque on two different supporting materials. An electron microscopic study. *Journal of Periodontology*, 50(8), 397–405.
 21. Bors, W., & Michel, C. (1999). Antioxidant capacity of flavanols and gallate esters: pulse radiolysis studies. *Free Radical Biology & Medicine*, 27(11-12), 1413–1426.
 22. Bors, W., Heller, W., Michel, C., & Saran, M. (1990a). Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods in Enzymology*, 186, 343–355.
 23. Bors, W., Heller, W., Michel, C., & Saran, M. (1990b). Radical chemistry of flavonoid antioxidants. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 264, 165–170.
 24. Bössmann, K., & Hoppe, W. F. (1974). [Experimental studies on the question of the function of the dental cuticle]. *Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift*, 29(11), 1030–1035.
 25. Bradway, S. D., Bergey, E. J., Jones, P. C., & Levine, M. J. (1989). Oral mucosal pellicle. Adsorption and transpeptidation of salivary components to buccal epithelial cells. *Biochemistry Journal*, 261(3), 887–896.
 26. Bradway, S. D., Bergey, E. J., Scannapieco, F. A., Ramasubbu, N., Zawacki, S., & Levine, M. J. (1992). Formation of salivary-mucosal pellicle: the role of transglutaminase. *Biochemistry Journal*, 284 (2), 557–564.
 27. Carlén, A., Börjesson, A. C., Nikdel, K., & Olsson, J. (1998). Composition of pellicles formed in vivo on tooth surfaces in different parts of the dentition, and in vitro on hydroxyapatite. *Caries Research*, 32(6), 447–455.
 28. Carlén, A., Rüdiger, S. G., Loggner, I., & Olsson, J. (2003). Bacteria-binding plasma proteins in pellicles formed on hydroxyapatite in vitro and on teeth in vivo. *Oral Microbiology and Immunology*, 18(4), 203–207.
 29. Carlson, J. R., Bauer, B. A., Vincent, A., Limburg, P. J., & Wilson, T. (2007). Reading the tea leaves: anticarcinogenic properties of (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Mayo Clinic Proceedings*, 82(6), 725–732.
 30. Carpenter, G. H., Pramanik, R., & Proctor, G. B. (2005). An in vitro model of chlorhexidine-induced tooth staining. *Journal of Periodontal Research*, 40(3), 225–230.
 31. Carter, O., Dashwood, R. H., Wang, R., Dashwood, W. M., Orner, G. A., Fischer, K. A., et al. (2007). Comparison of white tea, green tea, epigallocatechin-3-gallate, and caffeine as inhibitors of PhIP-induced colonic aberrant crypts. *Nutrition and Cancer*, 58(1), 60–65.
 32. Cassels, F. J., Hughes, C. V., & Nauss, J. L. (1995). Adhesin receptors of human oral bacteria and modeling of putative adhesin-binding domains. *Journal of Industrial Microbiology*, 15(3), 176–185.
 33. Chung, K. T., Wong, T. Y., Wei, C. I., Huang, Y. W., & Lin, Y. (1998). Tannins and human health: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38(6), 421–464.
 34. Cooper, K. A., Campos-Giménez, E., Jiménez Alvarez, D., Nagy, K., Donovan, J. L., & Williamson, G. (2007). Rapid reversed phase ultra-performance liquid chromatography analysis of the major cocoa polyphenols and inter-relationships of their concentrations in chocolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(8), 2841–2847.
 35. Cos, P., De Bruyne, T., Hermans, N., Apers, S., Berghe, D. V., & Vlietinck, A. J. (2004). Proanthocyanidins in health care: current and new trends. *Current Medicinal Chemistry*, 11(10), 1345–1359.
 36. da Silva, E. L., Abdalla, D. S., & Terao, J. (2000). Inhibitory effect of flavonoids on low-density lipoprotein peroxidation catalyzed by mammalian 15-lipoxygenase. *IUBMB Life*,

Literaturverzeichnis

- 49(4), 289–295.
37. Dashwood, W.-M., Orner, G. A., & Dashwood, R. H. (2002). Inhibition of beta-catenin/Tcf activity by white tea, green tea, and epigallocatechin-3-gallate (EGCG): minor contribution of H₂O₂ at physiologically relevant EGCG concentrations. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 296(3), 584–588.
38. Dawes, C. (1963). Disodium ethylenediaminetetraacetate as an aid for the reconstitution of lyophilized human salivary proteins before paper electrophoresis. *Archives of Oral Biology*, 8, 653–656.
39. Dawes, C. (2008). Salivary flow patterns and the health of hard and soft oral tissues. *Journal of the American Dental Association (1939)*, 139, 18–24.
40. Douglas, W. H., Reeh, E. S., Ramasubbu, N., Raj, P. A., Bhandary, K. K., & Levine, M. J. (1991). Statherin: a major boundary lubricant of human saliva. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 180(1), 91–97.
41. Droebner, K., Ehrhardt, C., Poetter, A., Ludwig, S., & Planz, O. (2007). CYSTUS052, a polyphenol-rich plant extract, exerts anti-influenza virus activity in mice. *Antiviral Research*, 76(1), 1–10.
42. Duckworth, R. M. (1993). The science behind caries prevention. *International Dental Journal*, 43(6 Suppl 1), 529–539.
43. Duke, S. A., & Forward, G. C. (1982). The conditions occurring in vivo when brushing with toothpastes. *British Dental Journal*, 152(2), 52–54.
44. Dulloo, A. G., Seydoux, J., Girardier, L., Chantre, P., & Vandermander, J. (2000). Green tea and thermogenesis: interactions between catechin-polyphenols, caffeine and sympathetic activity. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders : Journal of the International Association for the Study of Obesity*, 24(2), 252–258.
45. Ehrhardt, C., Hrincius, E. R., Korte, V., Mazur, I., Droebner, K., Poetter, A., et al. (2007). A polyphenol rich plant extract, CYSTUS052, exerts anti influenza virus activity in cell culture without toxic side effects or the tendency to induce viral resistance. *Antiviral Research*, 76(1), 38–47.
46. Embery, G., Heaney, T. G., & Stanbury, J. B. (1986). Studies on the organic polyanionic constituents of human acquired dental pellicle. *Archives of Oral Biology*, 31(9), 623–625.
47. Engelhardt, U. H. (1995). *Polyphenole im Tee*.
48. Ericson, T., Pruitt, K. M., Arwin, H., & Lundström, I. (1982). Ellipsometric studies of film formation on tooth enamel and hydrophilic silicon surfaces. *Acta Odontologica Scandinavica*, 40(4), 197–201.
49. Erlund, I., Alfthan, G., Mäenpää, J., & Aro, A. (2001a). Tea and coronary heart disease: the flavonoid quercetin is more bioavailable from rutin in women than in men. *Archives of Internal Medicine*, 161(15), 1919–1920.
50. Erlund, I., Kosonen, T., Alfthan, G., Mäenpää, J., Perttunen, K., Kenraali, J., et al. (2000). Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 56(8), 545–553.
51. Erlund, I., Meririnne, E., Alfthan, G., & Aro, A. (2001b). Plasma kinetics and urinary excretion of the flavanones naringenin and hesperetin in humans after ingestion of orange juice and grapefruit juice. *The Journal of Nutrition*, 131(2), 235–241.
52. Ferrazzano, G. F., Amato, I., Ingenito, A., De Natale, A., & Pollio, A. (2009). Anti-cariogenic effects of polyphenols from plant stimulant beverages (cocoa, coffee, tea). *Fittoterapia*, 80(5), 255–262.
53. Formica, J. V., & Regelson, W. (1995). Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids. *Food and Chemical Toxicology : an International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 33(12), 1061–1080.
54. Franzò, D., Philpotts, C. J., Cox, T. F., & Joiner, A. (2010). The effect of toothpaste concentration on enamel and dentine wear in vitro. *Journal of Dentistry*, 38(12), 974–979.

Literaturverzeichnis

55. Fraňová, S., Strapková, A., Mokřý, J., Sutovská, M., Jošková, M., Sadloňová, V., et al. (2011). Pharmacologic modulation of experimentally induced allergic asthma. *Interdisciplinary Toxicology*, 4(1), 27–32.
56. Ganss, C., Klimek, J., & Schwarz, N. (2000). A comparative profilometric in vitro study of the susceptibility of polished and natural human enamel and dentine surfaces to erosive demineralization. *Archives of Oral Biology*, 45(10), 897–902.
57. Ganss, C., Klimek, J., Schäffer, U., & Spall, T. (2001). Effectiveness of two fluoridation measures on erosion progression in human enamel and dentine in vitro. *Caries Research*, 35(5), 325–330.
58. Garcia, V., Arts, I. C. W., Sterne, J. A. C., Thompson, R. L., & Shaheen, S. O. (2005). Dietary intake of flavonoids and asthma in adults. *The European Respiratory Journal*, 26(3), 449–452.
59. Glantz, P. O., Baier, R. E., & Christersson, C. E. (1996). Biochemical and physiological considerations for modeling biofilms in the oral cavity: a review. *Dental Materials : Official Publication of the Academy of Dental Materials*, 12(3), 208–214.
60. Graf, B. A., Milbury, P. E., & Blumberg, J. B. (2005). Flavonols, flavones, flavanones, and human health: epidemiological evidence. *Journal of Medicinal Food*, 8(3), 281–290.
61. Guo, S., Bezard, E., & Zhao, B. (2005). Protective effect of green tea polyphenols on the SH-SY5Y cells against 6-OHDA induced apoptosis through ROS-NO pathway. *Free Radical Biology & Medicine*, 39(5), 682–695.
62. Guo, S., Yan, J., Yang, T., Yang, X., Bezard, E., & Zhao, B. (2007). Protective effects of green tea polyphenols in the 6-OHDA rat model of Parkinson's disease through inhibition of ROS-NO pathway. *Biological Psychiatry*, 62(12), 1353–1362.
63. Halliwell, B. (1994). Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet*, 344(8924), 721–724.
64. Hamada, S., & Slade, H. D. (1980). Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiological Reviews*, 44(2), 331–384.
65. Hamilton-Miller, J. M. (2001). Anti-cariogenic properties of tea (*Camellia sinensis*). *Journal of Medical Microbiology*, 50(4), 299–302.
66. Hannig, C., Attin, T., Hannig, M., Henze, E., Brinkmann, K., & Zech, R. (2004a). Immobilisation and activity of human alpha-amylase in the acquired enamel pellicle. *Archives of Oral Biology*, 49(6), 469–475.
67. Hannig, C., Becker, K., Häusler, N., Hoth-Hannig, W., Attin, T., & Hannig, M. (2007). Protective effect of the in situ pellicle on dentin erosion - an ex vivo pilot study. *Archives of Oral Biology*, 52(5), 444–449.
68. Hannig, C., Berndt, D., Hoth-Hannig, W., & Hannig, M. (2009a). The effect of acidic beverages on the ultrastructure of the acquired pellicle--an in situ study. *Archives of Oral Biology*, 54(6), 518–526.
69. Hannig, C., Hannig, M., & Attin, T. (2005a). Enzymes in the acquired enamel pellicle. *European Journal of Oral Sciences*, 113(1), 2–13.
70. Hannig, C., Hoch, J., Becker, K., Hannig, M., & Attin, T. (2005b). Lysozyme activity in the initially formed in situ pellicle. *Archives of Oral Biology*, 50(9), 821–828.
71. Hannig, C., Ruggeri, A., Al-Khayer, B., Schmitz, P., Spitzmüller, B., Deimling, D., et al. (2008a). Electron microscopic detection and activity of glucosyltransferase B, C, and D in the in situ formed pellicle. *Archives of Oral Biology*, 53(11), 1003–1010.
72. Hannig, C., Sorg, J., Spitzmüller, B., Hannig, M., & Al-Ahmad, A. (2009b). Polyphenolic beverages reduce initial bacterial adherence to enamel in situ. *Journal of Dentistry*, 37(7), 560–566.
73. Hannig, C., Spitzmüller, B., Al-Ahmad, A., & Hannig, M. (2008b). Effects of Cistus-tea on bacterial colonization and enzyme activities of the in situ pellicle. *Journal of Dentistry*, 36(7), 540–545.

Literaturverzeichnis

74. Hannig, C., Spitzmüller, B., Hoth-Hannig, W., & Hannig, M. (2011). Targeted immobilisation of lysozyme in the enamel pellicle from different solutions. *Clinical Oral Investigations*, 15(1), 65–73.
75. Hannig, C., Spitzmüller, B., Miller, M., Hellwig, E., & Hannig, M. (2008c). Intrinsic enzymatic crosslinking and maturation of the in situ pellicle. *Archives of Oral Biology*, 53(5), 416–422.
76. Hannig, M. (1994). *Hannig: Bildung, Funktion und Bedeutung des Pellikel*. I. Biochemische, bakteriologische und strukturelle Aspekte. *Oral-Prophylaxe*, 16, 39–46.
77. Hannig, M. (1997). Transmission electron microscopic study of in vivo pellicle formation on dental restorative materials. *European Journal of Oral Sciences*, 105(5), 422–433.
78. Hannig, M. (1999). Ultrastructural investigation of pellicle morphogenesis at two different intraoral sites during a 24-h period. *Clinical Oral Investigations*, 3(2), 88–95.
79. Hannig, M. (2002). The protective nature of the salivary pellicle. *International Dental Journal*, 52(5), 417–423.
80. Hannig, M., & Balz, M. (1999). Influence of in vivo formed salivary pellicle on enamel erosion. *Caries Research*, 33(5), 372–379.
81. Hannig, M., & Balz, M. (2001). Protective properties of salivary pellicles from two different intraoral sites on enamel erosion. *Caries Research*, 35(2), 142–148.
82. Hannig, M., & Bössmann, K. (1988a). [Removability of tooth deposits by cleaning with toothbrushes and toothpaste]. *Oral-Prophylaxe*, 10(1), 3–10.
83. Hannig, M., & Bössmann, K. (1988b). [The importance of the resistance of the pellicle to abrasion in tooth cleansing with fluoridated tooth pastes]. *Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift*, 43(8), 880–883.
84. Hannig, M., & Joiner, A. (2006). The structure, function and properties of the acquired pellicle. *Monographs in Oral Science*, 19, 29–64.
85. Hannig, M., Dounis, E., Henning, T., Apitz, N., & Stösser, L. (2006). Does irradiation affect the protein composition of saliva? *Clinical Oral Investigations*, 10(1), 61–65.
86. Hannig, M., Döbert, A., Stigler, R., Müller, U., & Prokhorova, S. A. (2004b). Initial salivary pellicle formation on solid substrates studied by AFM. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 4(5), 532–538.
87. Hannig, M., Fiebiger, M., Güntzer, M., Döbert, A., Zimehl, R., & Nekrashevych, Y. (2004c). Protective effect of the in situ formed short-term salivary pellicle. *Archives of Oral Biology*, 49(11), 903–910.
88. Hannig, M., Hess, N. J., Hoth-Hannig, W., & De Vrese, M. (2003). Influence of salivary pellicle formation time on enamel demineralization--an in situ pilot study. *Clinical Oral Investigations*, 7(3), 158–161.
89. Harborne, J. B., & Williams, C. A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55(6), 481–504.
90. Harborne, J. B., & Williams, C. A. (2001). Anthocyanins and other flavonoids. *Natural Product Reports*, 18(3), 310–333.
91. Haslam, E. (1996). Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *Journal of Natural Products*, 59(2), 205–215.
92. Hattori, M., Kusumoto, I. T., Namba, T., Ishigami, T., & Hara, Y. (1990). Effect of tea polyphenols on glucan synthesis by glucosyltransferase from *Streptococcus mutans*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 38(3), 717–720.
93. Hay, D. I. (1967). The adsorption of salivary proteins by hydroxyapatite and enamel. *Archives of Oral Biology*, 12(8), 937–946.
94. Hay, D. I. (1973). The interaction of human parotid salivary proteins with hydroxyapatite. *Archives of Oral Biology*, 18(12), 1517–1529.
95. Heasman, P. A., Stacey, F., Heasman, L., Sellers, P., Macgregor, I. D., & Kelly, P. J. (1999). A comparative study of the Philips HP 735, Braun/Oral B D7 and the Oral B 35

Literaturverzeichnis

- Advantage toothbrushes. *Journal of Clinical Periodontology*, 26(2), 85–90.
96. Hefferren, J. J. (1976). A laboratory method for assessment of dentifrice abrasivity. *Journal of Dental Research*, 55(4), 563–573.
97. Hellwig, E., Klimek, J., & Attin, T. (2007). *Einführung in die Zahnerhaltung*. Elsevier, Urban&Fischer Verlag.
98. Hertog, M. G., Feskens, E. J., Hollman, P. C., Katan, M. B., & Kromhout, D. (1993a). Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet*, 342(8878), 1007–1011.
99. Hertog, M. G., Hollman, P. C., Katan, M. B., & Kromhout, D. (1993b). Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. *Nutrition and Cancer*, 20(1), 21–29.
100. Hooper, S., West, N. X., Pickles, M. J., Joiner, A., Newcombe, R. G., & Addy, M. (2003). Investigation of erosion and abrasion on enamel and dentine: a model in situ using toothpastes of different abrasivity. *Journal of Clinical Periodontology*, 30(9), 802–808.
101. Hoppe, W. F., & Bössmann, K. (1968). [The role of saliva in the formation of dental plaque]. *Zahnärztliche Praxis*, 19(12), 133–134.
102. Hotz, P. R. (1983). [Studies on the abrasiveness of toothpastes]. *Schweizerische Monatsschrift Für Zahnheilkunde = Revue Mensuelle Suisse D'odonto-Stomatologie / SSO*, 93(2), 93–99.
103. Ielpo, M. T., Basile, A., Miranda, R., Moscatiello, V., Nappo, C., Sorbo, S., et al. (2000). Immunopharmacological properties of flavonoids. *Fitoterapia*, 71 Suppl 1, S101–9.
104. Iso, H., Date, C., Wakai, K., Fukui, M., Tamakoshi, A., JACC Study Group. (2006). The relationship between green tea and total caffeine intake and risk for self-reported type 2 diabetes among Japanese adults. *Annals of Internal Medicine*, 144(8), 554–562.
105. Jaeggi, T., & Lussi, A. (1999). Toothbrush abrasion of erosively altered enamel after intraoral exposure to saliva: an in situ study. *Caries Research*, 33(6), 455–461.
106. Jenkinson, H. F., & Lamont, R. J. (1997). Streptococcal adhesion and colonization. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 8(2), 175–200.
107. Joiner, A., Elofsson, U. M., & Arnebrant, T. (2006). Adsorption of chlorhexidine and black tea onto in vitro salivary pellicles, as studied by ellipsometry. *European Journal of Oral Sciences*, 114(4), 337–342.
108. Joiner, A., Muller, D., Elofsson, U. M., & Arnebrant, T. (2004a). Ellipsometry analysis of the in vitro adsorption of tea polyphenols onto salivary pellicles. *European Journal of Oral Sciences*, 112(6), 510–515.
109. Joiner, A., Muller, D., Elofsson, U. M., Malmsten, M., & Arnebrant, T. (2003). Adsorption from black tea and red wine onto in vitro salivary pellicles studied by ellipsometry. *European Journal of Oral Sciences*, 111(5), 417–422.
110. Joiner, A., Pickles, M. J., Tanner, C., Weader, E., & Doyle, P. (2004b). An in situ model to study the toothpaste abrasion of enamel. *Journal of Clinical Periodontology*, 31(6), 434–438.
111. Joiner, A., Schwarz, A., Philpotts, C. J., Cox, T. F., Huber, K., & Hannig, M. (2008). The protective nature of pellicle towards toothpaste abrasion on enamel and dentine. *Journal of Dentistry*, 36(5), 360–368.
112. Joiner, A., Weader, E., & Cox, T. F. (2004c). The measurement of enamel wear of two toothpastes. *Oral Health & Preventive Dentistry*, 2(4), 383–388.
113. Jung, W.-K., Choi, I., Oh, S., Park, S.-G., Seo, S.-K., Lee, S.-W., et al. (2009). Anti-asthmatic effect of marine red alga (*Laurencia undulata*) polyphenolic extracts in a murine model of asthma. *Food and Chemical Toxicology : an International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 47(2), 293–297.
114. Juriaanse, A. C. (1979). [Pellicle. A protein layer between enamel and plaque]. *Neder-*

Literatuurverzeichnis

- lands Tijdschrift Voor Tandheelkunde*, 86(1), 2–5.
115. Kato, M. T., Magalhães, A. C., Rios, D., Hannas, A. R., Attin, T., & Buzalaf, M. A. R. (2009). Protective effect of green tea on dentin erosion and abrasion. *Journal of Applied Oral Science : Revista FOB*, 17(6), 560–564.
 116. Kautsky, M. B., & Featherstone, J. D. (1993). Effect of salivary components on dissolution rates of carbonated apatites. *Caries Research*, 27(5), 373–377.
 117. Keli, S. O., Hertog, M. G., Feskens, E. J., & Kromhout, D. (1996). Dietary flavonoids, antioxidant vitamins, and incidence of stroke: the Zutphen study. *Archives of Internal Medicine*, 156(6), 637–642.
 118. Kiehne, A., & Engelhardt, U. H. (1996a). Thermospray-LC-MS analysis of various groups of polyphenols in tea. I. Catechins, flavonol O-glycosides and flavone C-glycosides. *Zeitschrift Für Lebensmittel-Untersuchung Und -Forschung*, 202(1), 48–54.
 119. Kiehne, A., & Engelhardt, U. H. (1996b). Thermospray-LC-MS analysis of various groups of polyphenols in tea. II: Chlorogenic acids, theaflavins and thearubigins. *Zeitschrift Für Lebensmittel-Untersuchung Und -Forschung*, 202(4), 299–302.
 120. Knekt, P., Jarvinen, R., Reunanen, A., & Maatela, J. (1996). Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 312(7029), 478–481.
 121. Knekt, P., Kumpulainen, J., Järvinen, R., Rissanen, H., Heliövaara, M., Reunanen, A., et al. (2002). Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 76(3), 560–568.
 122. Kobayashi, M., Ichitani, M., Suzuki, Y., Unno, T., Sugawara, T., Yamahira, T., et al. (2009). Black-tea polyphenols suppress postprandial hypertriacylglycerolemia by suppressing lymphatic transport of dietary fat in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(15), 7131–7136.
 123. Kousvelari, E. E., Baratz, R. S., Burke, B., & Oppenheim, F. G. (1980). Immunochemical identification and determination of proline-rich proteins in salivary secretions, enamel pellicle, and glandular tissue specimens. *Journal of Dental Research*, 59(8), 1430–1438.
 124. Kraus, F. W., Orstavik, D., Hurst, D. C., & Cook, C. H. (1973). The acquired pellicle: variability and subject-dependence of specific proteins. *Journal of Oral Pathology*, 2(3), 165–173.
 125. Kuboki, Y., Totsuka, M., Kaneko, A., Aso, K., Itoh, H., Aoki, H., et al. (1978). Hydroxyapatite-reactive salivary protein revealed by iso-electrofocusing electrophoresis. *The Bulletin of Tokyo Medical and Dental University*, 25(2), 123–131.
 126. Kuntz, S., Wenzel, U., & Daniel, H. (1999). Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. *European Journal of Nutrition*, 38(3), 133–142.
 127. Kuo, S. M. (1997). Dietary flavonoid and cancer prevention: evidence and potential mechanism. *Critical Reviews in Oncogenesis*, 8(1), 47–69.
 128. Lambrechts, P., Braem, M., Vuylsteke-Wauters, M., & Vanherle, G. (1989). Quantitative in vivo wear of human enamel. *Journal of Dental Research*, 68(12), 1752–1754.
 129. Lambrechts, P., Debels, E., Van Landuyt, K., Peumans, M., & Van Meerbeek, B. (2006). How to simulate wear? Overview of existing methods. *Dental Materials : Official Publication of the Academy of Dental Materials*, 22(8), 693–701.
 130. Leach, S. A. (1967). The acquired integuments of the teeth. A biochemical review. *British Dental Journal*, 122(12), 537–544.
 131. Leach, S. A., & Saxton, C. A. (1966). An electron microscopic study of the acquired pellicle and plaque formed on the enamel of human incisors. *Archives of Oral Biology*, 11(11), 1081–1094.
 132. Leinonen, J., Kivelä, J., Parkkila, S., Parkkila, A. K., & Rajaniemi, H. (1999). Salivary carbonic anhydrase isoenzyme VI is located in the human enamel pellicle. *Caries Re-*

Literaturverzeichnis

- search*, 33(3), 185–190.
133. Lendenmann, U., Grogan, J., & Oppenheim, F. G. (2000). Saliva and dental pellicle--a review. *Advances in Dental Research*, 14, 22–28.
134. Li, J., Helmerhorst, E. J., Troxler, R. F., & Oppenheim, F. G. (2004a). Identification of in vivo pellicle constituents by analysis of serum immune responses. *Journal of Dental Research*, 83(1), 60–64.
135. Li, J.-Y., Zhan, L., Barlow, J., Lynch, R. J., Zhou, X.-D., & Liu, T.-J. (2004b). [Effect of tea polyphenol on the demineralization and remineralization of enamel in vitro]. *Sichuan Da Xue Xue Bao. Yi Xue Ban = Journal of Sichuan University. Medical Science Edition*, 35(3), 364–366.
136. Lichtenthäler, R., Rodrigues, R. B., Maia, J. G. S., Papagiannopoulos, M., Fabricius, H., & Marx, F. (2005). Total oxidant scavenging capacities of Euterpe oleracea Mart. (Açaí) fruits. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 56(1), 53–64.
137. Lie, T. (1975). Pellicle formation on hydroxyapatite splints attached to the human dentition: morphologic confirmation of the concept of adsorption. *Archives of Oral Biology*, 20(11), 739–742.
138. Lie, T. (1977). Scanning and transmission electron microscope study of pellicle morphogenesis. *Scandinavian Journal of Dental Research*, 85(4), 217–231.
139. Liljemark, W. F., & Bloomquist, C. (1996). Human oral microbial ecology and dental caries and periodontal diseases. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* 7(2), 180–198.
140. Limsong, J., Benjavongkulchai, E., & Kuvatanasuchati, J. (2004). Inhibitory effect of some herbal extracts on adherence of Streptococcus mutans. *Journal of Ethnopharmacology*, 92(2-3), 281–289.
141. Lin, Y.-S., Tsai, Y.-J., Tsay, J.-S., & Lin, J.-K. (2003). Factors affecting the levels of tea polyphenols and caffeine in tea leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(7), 1864–1873.
142. Linkosalo, E., Ohtonen, S., Markkanen, H., Karinpää, A., & Kumpusalo, E. (1985). Caries, periodontal status and some salivary factors in lactovegetarians. *Scandinavian Journal of Dental Research*, 93(4), 304–308.
143. Loesche, W. J. (1986). Role of Streptococcus mutans in human dental decay. *Microbiological Reviews*, 50(4), 353–380.
144. Magalhães, A. C., Wiegand, A., Rios, D., Hannas, A., Attin, T., & Buzalaf, M. A. R. (2009). Chlorhexidine and green tea extract reduce dentin erosion and abrasion in situ. *Journal of Dentistry*, 37(12), 994–998.
145. Mair, L. H. (1999). Understanding wear in dentistry. *Compendium of Continuing Education in Dentistry (Jamesburg, N.J. : 1995)*, 20(1), 19–26
146. Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., & Rémésy, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1 Suppl), 230–242
147. Manning, J., & Roberts, J. C. (2003). Analysis of catechin content of commercial green tea products. *Journal of Herbal Pharmacotherapy*, 3(3), 19–32.
148. Marsh, P. D. (1999). Microbiologic aspects of dental plaque and dental caries. *Dental Clinics of North America*, 43(4), 599–614
149. Marwick, J. A., Ito, K., Adcock, I. M., & Kirkham, P. A. (2007). Oxidative stress and steroid resistance in asthma and COPD: pharmacological manipulation of HDAC-2 as a therapeutic strategy. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 11(6), 745–755.
150. Matsumoto, M., Minami, T., Sasaki, H., Sobue, S., Hamada, S., & Ooshima, T. (1999). Inhibitory effects of oolong tea extract on caries-inducing properties of mutans streptococci. *Caries Research*, 33(6), 441–445.
151. Maupomé, G., Aguilar-Avila, M., Medrano-Ugalde, H., & Borges-Yáñez, A. (1999). In

Literaturverzeichnis

- vitro quantitative microhardness assessment of enamel with early salivary pellicles after exposure to an eroding cola drink. *Caries Research*, 33(2), 140–147.
152. Mayhall, C. W. (1970). Concerning the composition and source of the acquired enamel pellicle of human teeth. *Archives of Oral Biology*, 15(12), 1327–1341.
 153. Mayhall, C. W. (1975). The physiological roles of saliva. *The Alabama Journal of Medical Sciences*, 12(1), 45–63.
 154. Mayhall, C. W. (1977). Amino acid composition of experimental salivary pellicles. *Journal of Periodontology*, 48(2), 78–91.
 155. Mayhall, C. W., & Butler, W. T. (1976). The carbohydrate composition of experimental salivary pellicles. *Journal of Oral Pathology*, 5(6), 358–370.
 156. Meckel, A. H. (1965). The formation and properties of organic films on teeth. *Archives of Oral Biology*, 10(4), 585–598.
 157. Meckel, A. H. (1968). The nature and importance of organic deposits on dental enamel. *Caries Research*, 2(2), 104–114.
 158. Meurman, J. H., & Frank, R. M. (1991). Scanning electron microscopic study of the effect of salivary pellicle on enamel erosion. *Caries Research*, 25(1), 1–6.
 159. Mierau, H. D., Haubitz, I., & Völk, W. (1989). [Habit patterns in the use of the manual toothbrush. 1]. *Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift*, 44(11), 836–841.
 160. Moore, C., & Addy, M. (2005). Wear of dentine in vitro by toothpaste abrasives and detergents alone and combined. *Journal of Clinical Periodontology*, 32(12), 1242–1246.
 161. Moreno, E. C., Kresak, M., & Hay, D. I. (1978). Adsorption of two human parotid salivary macromolecules on hydroxy-, fluorhydroxy- and fluorapatites. *Archives of Oral Biology*, 23(7), 525–533.
 162. Moreno, E. C., Kresak, M., & Hay, D. I. (1982). Adsorption thermodynamics of acidic proline-rich human salivary proteins onto calcium apatites. *The Journal of Biological Chemistry*, 257(6), 2981–2989.
 163. Murray, I. D., McCabe, J. F., & Storer, R. (1986). Abrasivity of denture cleaning pastes in vitro and in situ. *British Dental Journal*, 161(4), 137–141.
 164. Nekrashevych, Y., & Stösser, L. (2003). Protective influence of experimentally formed salivary pellicle on enamel erosion. An in vitro study. *Caries Research*, 37(3), 225–231.
 165. Nekrashevych, Y., Hannig, M., & Stösser, L. (2004). Assessment of enamel erosion and protective effect of salivary pellicle by surface roughness analysis and scanning electron microscopy. *Oral Health & Preventive Dentistry*, 2(1), 5–11.
 166. Nieuw Amerongen, A. V., Oderkerk, C. H., & Driessen, A. A. (1987). Role of mucins from human whole saliva in the protection of tooth enamel against demineralization in vitro. *Caries Research*, 21(4), 297–309.
 167. Nyvad, B., & Fejerskov, O. (1987). Transmission electron microscopy of early microbial colonization of human enamel and root surfaces in vivo. *Scandinavian Journal of Dental Research*, 95(4), 297–307.
 168. Ooshima, T., Minami, T., Aono, W., Tamura, Y., & Hamada, S. (1994a). Reduction of dental plaque deposition in humans by oolong tea extract. *Caries Research*, 28(3), 146–149.
 169. Ooshima, T., Yoshida, T., & Hamada, S. (1994b). Detection of caries-inducing microorganisms in hyposalivated rats without infection of mutans streptococci. *Microbiology and Immunology*, 38(1), 39–45.
 170. Orstavik, D., & Kraus, F. W. (1973). The acquired pellicle: immunofluorescent demonstration of specific proteins. *Journal of Oral Pathology*, 2(1), 68–76.
 171. Orstavik, D., & Kraus, F. W. (1974). The acquired pellicle: enzyme and antibody activities. *Scandinavian Journal of Dental Research*, 82(3), 202–205.
 172. Otake, S., Makimura, M., Kuroki, T., Nishihara, Y., & Hirasawa, M. (1991). Anticaries effects of polyphenolic compounds from Japanese green tea. *Caries Research*, 25(6),

Literaturverzeichnis

- 438–443.
173. Paganga, G., Miller, N., & Rice-Evans, C. A. (1999). The polyphenolic content of fruit and vegetables and their antioxidant activities. What does a serving constitute? *Free Radical Research*, 30(2), 153–162.
 174. Peng, G., Dixon, D. A., Muga, S. J., Smith, T. J., & Wargovich, M. J. (2006a). Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits cyclooxygenase-2 expression in colon carcinogenesis. *Molecular Carcinogenesis*, 45(5), 309–319.
 175. Peng, G., Wargovich, M. J., & Dixon, D. A. (2006b). Anti-proliferative effects of green tea polyphenol EGCG on Ha-Ras-induced transformation of intestinal epithelial cells. *Cancer Letters*, 238(2), 260–270.
 176. Philpotts, C. J., Weader, E., & Joiner, A. (2005). The measurement in vitro of enamel and dentine wear by toothpastes of different abrasivity. *International Dental Journal*, 55(3 Suppl 1), 183–187.
 177. Pickles, M. J., Joiner, A., Weader, E., Cooper, Y. L., & Cox, T. F. (2005). Abrasion of human enamel and dentine caused by toothpastes of differing abrasivity determined using an in situ wear model. *International Dental Journal*, 55(3 Suppl 1), 188–193.
 178. Proctor, G. B., Pramanik, R., Carpenter, G. H., & Rees, G. D. (2005). Salivary proteins interact with dietary constituents to modulate tooth staining. *Journal of Dental Research*, 84(1), 73–78.
 179. Pruitt, K. M., Caldwell, R. C., Jamieson, A. D., & Taylor, R. E. (1969). The interaction of salivary proteins with tooth surface. *Journal of Dental Research*, 48(5), 818–823.
 180. Ramasubbu, N., Thomas, L. M., Bhandary, K. K., & Levine, M. J. (1993). Structural characteristics of human salivary statherin: a model for boundary lubrication at the enamel surface. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine : an Official Publication of the American Association of Oral Biologists*, 4(3-4), 363–370.
 181. Rasheed, A., & Haider, M. (1998). Antibacterial activity of Camellia sinensis extracts against dental caries. *Archives of Pharmacal Research*, 21(3), 348–352.
 182. Rice-Evans, C. A., & Miller, N. J. (1996). Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochemical Society Transactions*, 24(3), 790–795.
 183. Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*, 20(7), 933–956.
 184. Rosen, S., Elvin-Lewis, M., Beck, F. M., & Beck, E. X. (1984). Anticariogenic effects of tea in rats. *Journal of Dental Research*, 63(5), 658–660.
 185. Rüdiger, S. G., Carlén, A., Meurman, J. H., Kari, K., & Olsson, J. (2002). Dental biofilms at healthy and inflamed gingival margins. *Journal of Clinical Periodontology*, 29(6), 524–530.
 186. Rykke, M., & Sønju, T. (1991). Amino acid composition of acquired enamel pellicle collected in vivo after 2 hours and after 24 hours. *Scandinavian Journal of Dental Research*, 99(6), 463–469.
 187. Saito, N. (1990). [Anti-caries effects of polyphenol compound from Camellia sinensis]. *Nichidai Kōkū Kagaku = Nihon University Journal of Oral Science*, 16(2), 154–163.
 188. Santana-Rios, G., Orner, G. A., Xu, M., Izquierdo-Pulido, M., & Dashwood, R. H. (2001). Inhibition by white tea of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine-induced colonic aberrant crypts in the F344 rat. *Nutrition and Cancer*, 41(1-2), 98–103.
 189. Saxer, U. P., Barbakow, J., & Yankell, S. L. (1998). New studies on estimated and actual toothbrushing times and dentifrice use. *The Journal of Clinical Dentistry*, 9(2), 49–51.
 190. Saxton, C. A. (1973). Scanning electron microscope study of the formation of dental plaque. *Caries Research*, 7(2), 102–119.
 191. Scalbert, A., & Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The Journal of Nutrition*, 130(8S Suppl), 2073S–85S.

Literaturverzeichnis

192. Scannapieco, F. A. (1994). Saliva-bacterium interactions in oral microbial ecology. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* 5(3-4), 203–248.
193. Schüpbach, P., Neeser, J. R., Golliard, M., Rouvet, M., & Guggenheim, B. (1996). Incorporation of caseinoglycomacropeptide and caseinophosphopeptide into the salivary pellicle inhibits adherence of mutans streptococci. *Journal of Dental Research*, 75(10), 1779–1788.
194. Schüpbach, P., Oppenheim, F. G., Lendenmann, U., Lamkin, M. S., Yao, Y., & Guggenheim, B. (2001). Electron-microscopic demonstration of proline-rich proteins, statherin, and histatins in acquired enamel pellicles in vitro. *European Journal of Oral Sciences*, 109(1), 60–68.
195. Sheen, S., Banfield, N., & Addy, M. (2001). The propensity of individual saliva to cause extrinsic staining in vitro--a developmental method. *Journal of Dentistry*, 29(2), 99–102.
196. Shellis, R. P., & Addy, M. (2014). The interactions between attrition, abrasion and erosion in tooth wear. *Monographs in Oral Science*, 25, 32–45.
197. Shellis, R. P., & Duckworth, R. M. (1994). Studies on the cariostatic mechanisms of fluoride. *International Dental Journal*, 44(3 Suppl 1), 263–273.
198. Skjørland, K. K., Rykke, M., & Sønju, T. (1995). Rate of pellicle formation in vivo. *Acta Odontologica Scandinavica*, 53(6), 358–362.
199. Slomiany, B. L., Murty, V. L., Mandel, I. D., Sengupta, S., & Slomiany, A. (1990). Effect of lipids on the lactic acid retardation capacity of tooth enamel and cementum pellicles formed in vitro from saliva of caries-resistant and caries-susceptible human adults. *Archives of Oral Biology*, 35(3), 175–180.
200. Slomiany, B. L., Murty, V. L., Zdebska, E., Slomiany, A., Gwozdziński, K., & Mandel, I. D. (1986). Tooth surface-pellicle lipids and their role in the protection of dental enamel against lactic-acid diffusion in man. *Archives of Oral Biology*, 31(3), 187–191.
201. Smith, Q. T. (1980). Acquired pellicle: a mediator of enamel demineralization and remineralization. *Northwest Dentistry*, 59(3), 152–155.
202. Smullen, J., Koutsou, G. A., Foster, H. A., Zumbé, A., & Storey, D. M. (2007). The antibacterial activity of plant extracts containing polyphenols against *Streptococcus mutans*. *Caries Research*, 41(5), 342–349.
203. Sønju, T. (1975). Investigations of some salivary glycoproteins and their possible role in pellicle formation. *Den Norske Tannlaegeforenings Tidende*, 85(10), 393–403.
204. Sønju, T., & Rölla, G. (1973). Chemical analysis of the acquired pellicle formed in two hours on cleaned human teeth in vivo. Rate of formation and amino acid analysis. *Caries Research*, 7(1), 30–38.
205. Sønju, T., Christensen, T. B., Kornstad, L., & Rölla, G. (1974). Electron microscopy, carbohydrate analyses and biological activities of the proteins adsorbed in two hours to tooth surfaces in vivo. *Caries Research*, 8(2), 113–122.
206. Tabak, L. A. (1995). In defense of the oral cavity: structure, biosynthesis, and function of salivary mucins. *Annual Review of Physiology*, 57(1), 547–564.
207. Tabak, L. A., Levine, M. J., Mandel, I. D., & Ellison, S. A. (1982). Role of salivary mucins in the protection of the oral cavity. *Journal of Oral Pathology*, 11(1), 1–17.
208. Tinanoff, N., Wei, S. H., & Parkins, F. M. (1974). Effect of a pumice prophylaxis on fluoride uptake in tooth enamel. *Journal of the American Dental Association* (1939), 88(2), 384–389.
209. Vacca Smith, A. M., & Bowen, W. H. (2000a). In situ studies of pellicle formation on hydroxyapatite discs. *Archives of Oral Biology*, 45(4), 277–291.
210. Vacca Smith, A. M., & Bowen, W. H. (2000b). The effects of milk and kappa-casein on salivary pellicle formed on hydroxyapatite discs in situ. *Caries Research*, 34(1), 88–93.
211. Vacca Smith, A. M., Ng-Evans, L., Wunder, D., & Bowen, W. H. (2000). Studies concerning the glucosyltransferase of *Streptococcus sanguis*. *Caries Research*, 34(4), 295–

Literaturverzeichnis

- 302.
212. Vacca Smith, A. M., Venkitaraman, A. R., Schilling, K. M., & Bowen, W. H. (1996). Characterization of glucosyltransferase of human saliva adsorbed onto hydroxyapatite surfaces. *Caries Research*, 30(5), 354–360.
213. Van der Weijden, G. A., Timmerman, M. F., Danser, M. M., & Van der Velden, U. (1998). Relationship between the plaque removal efficacy of a manual toothbrush and brushing force. *Journal of Clinical Periodontology*, 25(5), 413–416.
214. Van der Weijden, G. A., Timmerman, M. F., Reijerse, E., Snoek, C. M., & Van der Velden, U. (1996). Toothbrushing force in relation to plaque removal. *Journal of Clinical Periodontology*, 23(8), 724–729.
215. Vassilakos, N., Arnebrant, T., & Glantz, P. O. (1992a). Adsorption of whole saliva onto hydrophilic and hydrophobic solid surfaces: influence of concentration, ionic strength and pH. *Scandinavian Journal of Dental Research*, 100(6), 346–353.
216. Vassilakos, N., Arnebrant, T., & Glantz, P. O. (1993). An in vitro study of salivary film formation at solid/liquid interfaces. *Scandinavian Journal of Dental Research*, 101(3), 133–137.
217. Vassilakos, N., Arnebrant, T., Rundegren, J., & Glantz, P. O. (1992b). In vitro interactions of anionic and cationic surfactants with salivary fractions on well-defined solid surfaces. *Acta Odontologica Scandinavica*, 50(3), 179–188.
218. Vassilakos, N., Rundegren, J., Arnebrant, T., & Glantz, P. O. (1992c). Adsorption from salivary fractions at solid/liquid and air/liquid interfaces. *Archives of Oral Biology*, 37(7), 549–557.
219. Venables, M. C., Hulston, C. J., Cox, H. R., & Jeukendrup, A. E. (2008). Green tea extract ingestion, fat oxidation, and glucose tolerance in healthy humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 87(3), 778–784.
220. Volpe, A. R., Mooney, R., Zumbunnen, C., Stahl, D., & Goldman, H. M. (1975). A long term clinical study evaluating the effect of two dentifrices on oral tissues. *Journal of Periodontology*, 46(2), 113–118.
221. Voronets, J., Jaeggi, T., Buerger, W., & Lussi, A. (2008). Controlled toothbrush abrasion of softened human enamel. *Caries Research*, 42(4), 286–290.
222. Wang, R., Dashwood, W. M., Löhr, C. V., Fischer, K. A., Pereira, C. B., Louderback, M., et al. (2008). Protective versus promotional effects of white tea and caffeine on PhIP-induced tumorigenesis and beta-catenin expression in the rat. *Carcinogenesis*, 29(4), 834–839.
223. Watzl, B., & Rechkemmer, G. (2001). Flavonoide. *Ernährungs-Umschau*, 48, 498–502.
224. Watzl, B., & Rechkemmer, G. (2002). Anthocyane. *Ernährungs-Umschau*, 49, 148–150.
225. West, N., Addy, M., & Hughes, J. (1998). Dentine hypersensitivity: the effects of brushing desensitizing toothpastes, their solid and liquid phases, and detergents on dentine and acrylic: studies in vitro. *Journal of Oral Rehabilitation*, 25(12), 885–895.
226. Wiegand A, Attin T Design of erosion/abrasion studies--insights and rational concepts. *Caries Research*, 45(1),53-59
227. Williamson, G., Plumb, G. W., & Garcia-Conesa, M. T. (1999). Glycosylation, esterification and polymerization of flavonoids and hydroxycinnamates: effects on antioxidant properties. *Basic Life Sciences*, 66, 483–494.
228. Yan, Q., & Bennick, A. (1995). Identification of histatins as tannin-binding proteins in human saliva. *Biochemistry Journal*, 311 (Pt 1), 341–347.
229. Yao, Y., Berg, E. A., Costello, C. E., Troxler, R. F., & Oppenheim, F. G. (2003). Identification of protein components in human acquired enamel pellicle and whole saliva using novel proteomics approaches. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(7), 5300–5308.
230. Yao, Y., Grogan, J., Zehnder, M., Lendenmann, U., Nam, B., Wu, Z., et al. (2001). Compositional analysis of human acquired enamel pellicle by mass spectrometry. *Archives of*

Literaturverzeichnis

- Oral Biology*, 46(4), 293–303.
231. Yao, Y., Lamkin, M. S., & Oppenheim, F. G. (1999). Pellicle precursor proteins: acidic proline-rich proteins, statherin, and histatins, and their crosslinking reaction by oral transglutaminase. *Journal of Dental Research*, 78(11), 1696–1703.
232. Young, W., Khan, F., Brandt, R., Savage, N., Razek, A. A., & Huang, Q. (2001). Syndromes with salivary dysfunction predispose to tooth wear: Case reports of congenital dysfunction of major salivary glands, Prader-Willi, congenital rubella, and Sjögren's syndromes. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*, 92(1), 38–48.
233. Zahradnik, R. T., Moreno, E. C., & Burke, E. J. (1976). Effect of salivary pellicle on enamel subsurface demineralization in vitro. *Journal of Dental Research*, 55(4), 664–670.
234. Zahradnik, R. T., Propas, D., & Moreno, E. C. (1977). In vitro enamel demineralization by *Streptococcus mutans* in the presence of salivary pellicles. *Journal of Dental Research*, 56(9), 1107–1110.
235. Zahradnik, R. T., Propas, D., & Moreno, E. C. (1978). Effect of salivary pellicle formation time on in vitro attachment and demineralization by *Streptococcus mutans*. *Journal of Dental Research*, 57(11-12), 1036–1042.
236. Zhao, B. (2009). Natural antioxidants protect neurons in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Neurochemical Research*, 34(4), 630–638.
237. Łuczaj, W., & Skrzydlewska, E. (2005). Antioxidative properties of black tea. *Preventive Medicine*, 40(6), 910–918.

Publikationen/Danksagungen

7 Publikation/ Danksagung

Publikation

Auszüge der vorliegenden Dissertation wurden im Journal of Dentistry publiziert:

Joiner, A., Schwarz, A., Philpotts C., Cox, T.F., Huber, K., Hannig, M. : The protective nature of pellicle towards toothpaste abrasion on enamel and dentin. J Dent 36, 360-368 (2008)

Danksagung

Ich danke in erster Linie meinem Doktorvater Herrn Prof. Matthias Hannig für die Bereitstellung des Themas, der intensiven Betreuung und der Korrekturlesung mit Anmerkungen und Ideen zur Verbesserung.

Ein besonderes Wort des Dankes möchte ich an Frau Dr. Karin Huber richten, die mir in den Vor- und Nachbereitungen des experimentellen Teils unermüdlich zur Seite stand und stets ein offenes Ohr und viel Geduld mit mir hatte.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Dr. Andrew Joiner und seinem Team von Unilever für die Unterstützung bei der statistischen Analyse und für die herzliche Aufnahme in Bebington/Wirral (England) während der Forschungszeit und die Überlassung der „Zahnputzmaschine“.

Des Weiteren bin ich Frau Wiebke Hoth-Hannig ebenso zu Dank verpflichtet, wie Frau Gabriele Kiefer und Norbert Pütz (Anatomie), die mit Ihren Erfahrungen am Mikrotom und am TEM zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie für ihren steten Zuspruch und ihren Glauben an mich und das Projekt.

